



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Regeneración de aguas depuradas mediante
fotocatálisis heterogénea con dióxido de titanio:
Análisis de variables influyentes

Autora

Amparo Ungría Castillo

Directora y Ponente

Silvia Escuadra Delso

M^aPeña Ormad Melero

Grado en Ingeniería Química

Escuela de Ingeniería y Arquitectura

Abril 2016



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./D^a. Amparo Ungría Castillo,

con nº de DNI 17771499C en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)
Grado en Ingeniería Química, (Título del Trabajo)
Regeneración de aguas depuradas mediante fotocátalisis heterogénea con
dióxido de titanio: Análisis de variables influyentes

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 22 Abril de 2016

Fdo: Amparo Ungría Castillo

Regeneración de aguas depuradas mediante fotocátalisis heterogénea con dióxido de titanio: Análisis de variables influyentes

RESUMEN

Las aguas de salida de depuradora pueden ser reutilizadas para diversos fines siempre que cumplan los criterios de calidad establecidos en la legislación vigente. Sin embargo, la presencia de determinados contaminantes (como microorganismos patógenos) en las aguas depuradas puede limitar su uso, siendo necesario un tratamiento previo. Los métodos de desinfección más utilizados en las plantas de regeneración de aguas residuales son cloración y radiación UV, pero actualmente se investigan técnicas alternativas como los procesos de oxidación avanzada. Estos procesos se basan en la generación de especies radicalarias muy reactivas, como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), con elevado poder de desinfección sobre los microorganismos presentes en el agua. Los radicales se generan de diferentes formas, por ejemplo mediante radiación UVA o fotocátalisis con TiO_2 , que son las técnicas empleadas en el presente proyecto.

El objetivo de este proyecto es investigar sobre la aplicación de la fotocátalisis en la inactivación de determinadas bacterias presentes en aguas de salida de depuradora, en concreto sobre *Escherichia coli* y *Enterococcus* sp. y compararlo con la desinfección obtenida mediante irradiación UVA-VIS en ausencia de catalizador. Para llevar a cabo este objetivo, se realiza un análisis de la influencia de las variables y su interacción que pudieran afectar al grado de desinfección, como son la matriz, la dosis de TiO_2 , el tiempo de tratamiento, la intensidad de la radiación, la temperatura o el tipo de bacteria, estudiando también estas variables a partir de los parámetros obtenidos de la modelización cinética de los resultados. Se aplica el tratamiento fotocatalítico con TiO_2 en suspensión en muestras de agua sintética, de agua de salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) sintética y de agua de salida de una EDAR real. Se realizan ensayos de reutilización en discontinuo del catalizador en para estudiar la pérdida de eficacia del catalizador con el uso.

De los resultados de inactivación se concluye que la presencia de TiO_2 supone, en general, un aumento en la eficacia de inactivación de los tratamientos mediante irradiación UVA-VIS. La composición del agua tiene elevada influencia, siendo la inactivación notablemente inferior en agua de salida de depuradora, matriz más compleja, que en la muestra de suspensión bacteriana en NaCl al 0,9%. El tiempo de tratamiento y la dosis de TiO_2 son variables influyentes, en general una duración mayor de la irradiación así como una mayor dosis de dióxido de titanio supone mayor inactivación bacteriana. Por último, se concluye que la bacteria grampositiva *Enterococcus* sp. es más resistente a los tratamientos basados en irradiación UVA-VIS que la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*. Los parámetros obtenidos de la modelización cinética son acordes con los resultados observados.

El daño producido por los tratamientos basados en irradiación UVA-VIS es irreversible. No se produce un recrecimiento de *Escherichia coli* 24 horas después de finalizar el tratamiento de fotocátalisis en presencia de TiO_2 .

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. Contaminación microbiológica en aguas de salida de depuradora	3
2.2. Tratamientos de desinfección de aguas contaminadas	5
2.2.1. Radiación solar	5
2.2.2. Tratamientos de oxidación avanzada para la desinfección	6
2.2.3. Fotocatálisis con dióxido de titanio.....	7
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	9
3.1. Metodología analítica.....	9
3.1.1. Determinación de parámetros físico-químicos	9
3.1.2. Determinación de parámetros microbiológicos.....	9
3.2. Muestras.....	12
3.2.1. Suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl	12
3.2.2. Agua de salida de EDAR.....	12
3.3. Materiales e instrumentación en tratamientos fotocatalíticos	13
3.3.1. Dióxido de titanio	13
3.3.2. Equipos	14
3.4. Procedimiento general en tratamientos de fotocatálisis.....	15
3.5. Diseño de experimentos y análisis estadístico de variables influyentes	15
3.6. Modelización cinética de inactivación bacteriana	16
3.7. Ensayos de reutilización del TiO ₂ en discontinuo.....	18
3.8. Ensayos de recrecimiento bacteriano	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1. Estudio de las variables influyentes en los tratamientos.....	21
4.1.1. Estudio de la influencia de la dosis de TiO ₂ y del tipo de bacteria.....	21
4.1.2. Estudio de la influencia del tiempo de tratamiento.....	22
4.1.3. Estudio de la influencia de la intensidad de tratamiento	25
4.1.4. Estudio de la influencia de la dosis de UVA-vis	25
4.1.5. Estudio de la influencia de la temperatura	26
4.1.6. Estudio de la influencia de la matriz	29

4.2.	Análisis estadístico de variables mediante Statgraphics.....	31
4.3.	Modelización cinética.....	35
4.4.	Ensayos de reutilización	37
4.5.	Ensayos de recrecimiento bacteriano	38
5.	CONCLUSIONES	39
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las aguas de salida de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) pueden ser reutilizadas para diferentes usos como: agrícolas (regadío), urbanos (limpieza de calles), industriales, recreativos o ambientales. La reutilización de aguas residuales para estos fines resulta beneficiosa ya que permite la mejora en la gestión de recursos hídricos. Por tanto, esto supone un ahorro económico y de energía.

Además, permite un aumento en los recursos disponibles en las zonas donde el efluente tratado se descarga normalmente al mar y se reducen los contaminantes que se vierten a los cursos de agua. De esta manera se aprovechan también los nutrientes que contienen las aguas reutilizadas en agricultura, reduciendo así la cantidad de fertilizantes usados. Todo esto hace que la reutilización de aguas residuales sea un medio válido y eficaz para conseguir una gestión de los recursos hídricos más equilibrada y sostenible (Iglesias Esteban y Ortega de Miguel, 2008).

La reutilización de aguas de salida de depuradora (EDAR) en España está regulada por el RD 1620/2007. Este Real Decreto establece los requisitos mínimos que deben cumplir las aguas para poder ser reutilizadas según el fin al que vayan destinadas. Las aguas de salida de depuradora pueden contener materia orgánica, sustancias contaminantes y microorganismos patógenos (Mosteo et al., 2013) por lo que generalmente deben ser tratados para poder ser reutilizadas según los criterios establecidos en la legislación.

Actualmente, se investigan y desarrollan técnicas alternativas de desinfección a las utilizadas tradicionalmente como la cloración y la radiación ultravioleta. Estos nuevos tratamientos, que se basan en la generación de especies radicalarias, se denominan procesos de oxidación avanzada (POAs). Algunos de estos procesos son: irradiación ultravioleta, fotocátalisis con dióxido de titanio (TiO_2), ozonización, electrólisis, proceso fenton, ultrasonidos y oxidación con aire húmedo (Comninellis et al., 2008).

El principal objetivo de este trabajo fin de grado (TFG) se centra en la regeneración de aguas depuradas mediante fotocátalisis heterogénea con TiO_2 . En este proceso de oxidación avanzada los radicales se forman por interacción del catalizador y luz ultravioleta (Malato et al., 2009). En concreto, se estudia la eliminación de *E.coli* y *Enterococcus sp.* presentes en efluentes de EDAR, parámetros indicadores de contaminación fecal, analizando la influencia de distintas variables operacionales en el tratamiento mediante Statgraphics (versión para Windows). Las variables estudiadas son:

- La dosis de TiO_2 utilizada: se estudia el efecto de la concentración de catalizador en la desinfección.
- El tiempo de tratamiento: se analiza la desinfección para distintos tiempos de tratamiento de fotocátalisis.
- La intensidad de luz: se estudia el efecto de esta variable para determinar cómo afecta en la eliminación de los microorganismos.
- Temperatura: se analiza la desinfección para las temperaturas de 10, 21 y 33°C.

- El tipo de matriz: se aplica el tratamiento en muestras de agua sintética y en aguas de salida de depuradora (EDAR).
- El tipo de microorganismo: se comparan los resultados de desinfección para dos tipos de bacterias diferentes: *Escherichia coli* (bacteria gramnegativa) y *Enterococcus sp.* (bacteria grampositiva).

De manera adicional:

- Se realiza una modelización cinética de los datos experimentales de desinfección obtenidos aplicando diversos modelos matemáticos.
- Se analiza también la eficacia del dióxido de titanio durante su reutilización en la desinfección de agua sintética fortificada con *Escherichia coli*, para estudiar la eficacia de desinfección del catalizador con el uso.
- Se analiza el recrecimiento de las bacterias objeto de estudio 24 horas después del tratamiento fotocatalítico.

El presente trabajo fin de grado se realiza dentro del grupo de investigación “Calidad y Tratamiento de Aguas” perteneciente al IUCA (Instituto Universitario de Investigación y Ciencias Ambientales de Aragón) y al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Contaminación microbiológica en aguas de salida de depuradora

Según se indica en la normativa vigente (Directiva 91/271/CEE), las aguas de salida de una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) deben cumplir una serie de especificaciones antes de ser vertidas a los cauces naturales. En dicha Directiva aparecen legislados algunos parámetros contaminantes tales como: DBO₅ a 20°C (<25 mg/L O₂), DQO (<125 mg/L O₂), Total Sólidos en Suspensión (<60 mg/L). Además, en zonas eutróficas o con tendencia a serlo se controlan también: fósforo total (P<2 mg/L) y nitrógeno total (N<15 mg/L). Sin embargo, no se establecen límites para microorganismos patógenos.

Para poder reutilizar dicha agua de salida de depuradora, se debe cumplir además la legislación correspondiente, es decir, el Real Decreto 1620/2007 que regula algunos parámetros en función del destino de su reutilización: urbano, agrícola, recreativo, industrial o ambiental. Este Real Decreto establece las normas de calidad (NCs) para determinados microorganismos patógenos según el destino del agua a reutilizar (Mosteo et al., 2013). Así pues, para todos los usos citados anteriormente se establecen valores medios admisibles para nematodos intestinales y *Escherichia coli* (ver Tabla 1). Además para la reutilización del agua en la industria también se debe controlar la *Legionella spp.* y la *Salmonella spp.*

Tabla 1. Criterios de calidad microbiológica para reutilización de aguas según sus usos (RD 1620/2007).

USOS	VALOR MÁXIMO ADMISIBLE (VMA)	
	<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 mL)	Nematodos intestinales (huevos/10 L)
1. URBANO		
Calidad 1.1	0	1
Calidad 1.2	200	1
2. AGRÍCOLA		
Calidad 2.1	100	1
Calidad 2.2	1000	1
Calidad 2.3	10000	1
3. INDUSTRIAL		
Calidad 3.1 (a,b)	10000	---
Calidad 3.1 (c)	1000	1
Calidad 3.2	Ausencia	1
4. RECREATIVO		
Calidad 4.1	200	1
Calidad 4.2	10000	---
5. AMBIENTAL		
Calidad 5.1	1000	---
Calidad 5.2	0	1
Calidad 5.3	---	---
Calidad 5.4	La calidad mínima se estudiará caso por caso	

Escherichia coli está presente en el tracto digestivo humano y de animales y por tanto, en sus excrementos. La presencia de *Escherichia coli* puede revelar que haya otros patógenos entéricos como *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia*, (García-Fernández et al., 2015). Por ello, se utilizan como indicador de contaminación microbiológica (Rodríguez-Chueca et al., 2015). *Escherichia coli* puede provocar desde una diarrea y vómitos, hasta una cistitis o una colitis hemorrágica o incluso una meningitis aguda.

Además de *E. coli*, se considera fundamental el control de *Enterococcus sp.*, dado su carácter patógeno (puede provocar enfermedades como peritonitis, infecciones del tracto urinario, endocarditis, etc). Es una bacteria con origen también fecal y por lo tanto abundante en las aguas residuales urbanas objeto de reutilización (Rodríguez-Chueca et al., 2013).

La principal diferencia entre *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* es que son bacterias Gram-negativas y Gram-positivas respectivamente, esto se traduce en una diferencia significativa en su estructura (Foster et al., 2011). Tal y como se puede apreciar en la Figura 1, las bacterias Gram-positivas tienen una capa gruesa de peptidoglucano (zona morada en la izquierda, Figura 1) mientras que las Gram-negativas tienen esta capa mucho más delgada (línea fina negra en la derecha, Figura 1) y una membrana externa adicional (Murray et al., 2013).

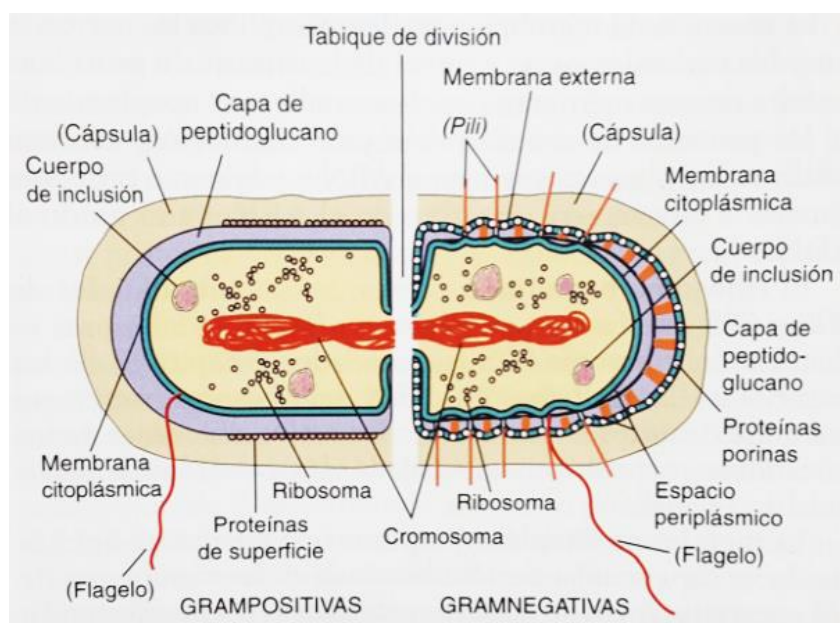


Figura 1. Bacterias Gram-positivas (izquierda) y Gram-negativas (derecha). Las estructuras cuyo nombre aparecen entre paréntesis no se encuentran siempre en estas bacterias (Murray et al., 2013).

La capa gruesa de peptidoglucano es la responsable de que las bacterias Gram-positivas como *Enterococcus sp.*, puedan previsiblemente ser más resistentes a los diferentes tratamientos de una EDAR, y en consecuencia es interesante su estudio como indicador fecal además de *E. coli* (Gram-negativa).

2.2. Tratamientos de desinfección de aguas contaminadas

Los contaminantes microbiológicos se eliminan tradicionalmente mediante el método de desinfección con cloro, pero en presencia de materia orgánica en el agua, esta puede reaccionar con el oxidante dando lugar a subproductos peligrosos y con propiedades mutagénicas y carcinogénicas como son los trihalometanos (Matamoros et al., 2007; Wang et al., 2015).

En consecuencia, se está investigando la aparición de otras tecnologías que no generen dichos compuestos indeseados, basadas en la aplicación de radiación solar y procesos de oxidación avanzada, entre los que cabe destacar la fotocatalisis con TiO_2 y ya no hay más correcciones.

2.2.1. Radiación solar

La irradiación solar que incide en la atmósfera exterior de la Tierra antes de llegar a la superficie, es de aproximadamente 1360 W/m^2 , aunque este valor varía con la posición dentro de la órbita alrededor del sol, el vapor de agua, dióxido de carbono, ozono, oxígeno y otros, además de contaminantes capaces de dispersar y absorber parte de esta radiación. En un día despejado de verano en el ecuador la irradiación recibida es 1120 W/m^2 . Este valor se reduce según aumenta la distancia al ecuador (McGuigan et al., 2012).

En muchas plantas de tratamiento de aguas se lleva a cabo la desinfección mediante radiación ultravioleta que a 254 nm es letal para todos los microorganismos, pero es un proceso que supone alto coste. Un tratamiento alternativo de bajo coste en zonas sin recursos, es la desinfección solar (SODIS). Mediante insolación de al menos 6 horas en recipientes cerrados, se consigue la inactivación de microorganismos consecuencia del uso combinado de radiación UV-A y el incremento en la temperatura del agua, consiguiendo que el agua sea apta para su consumo (Byrne et al., 2011). En la Figura 2 se muestra un ejemplo de este tratamiento (SODIS).



Figura 2. Descripción gráfica del tratamiento de desinfección solar (SODIS) (McGuigan et al., 2012).

La radiación solar comprende desde el infrarrojo hasta el ultravioleta. Dentro de este intervalo, los rangos de longitud de onda de la radiación UV son: 400 a 315 nm para la radiación UVA;

315 a 280 nm para UVB; y 280 a 100 nm para UVC. La luz solar consiste principalmente en radiación UVA, puesto que el rango UVC y parte del UVB son absorbidos por la capa de ozono.

La inactivación mediante radiación UV-VIS de las células microbianas se produce a través de una gran variedad de mecanismos dependiendo del tipo de radiación UV utilizada para la inactivación. El principal mecanismo de inactivación a través de radiación solar es un proceso de oxidación debido a la generación de ROS ya que la radiación UVA no es capaz de dañar directamente el ADN celular. Cuando los ROS interactúan con el ADN producen roturas de la cadena simple y modificaciones de la base nucleica que pueden ser letales y mutagénicas (McGuigan et al., 2012).

Actualmente, se desarrollan otros tratamientos alternativos para la desinfección de aguas como son los procesos de oxidación avanzada (POAs), que incluyen, entre otros, tratamientos basados en ozono o en irradiación UV-visible (Rojas-Higuera et al., 2010).

2.2.2. Tratamientos de oxidación avanzada para la desinfección

La clasificación de los POAs se suele llevar a cabo teniendo en cuenta la fase de reacción (heterogénea u homogénea) o el método de generación de ROS (químico, electroquímico, sonoquímico y fotoquímico). La Figura 3 muestra algunos de los POAs más utilizados llevados a cabo con los diferentes reactivos.

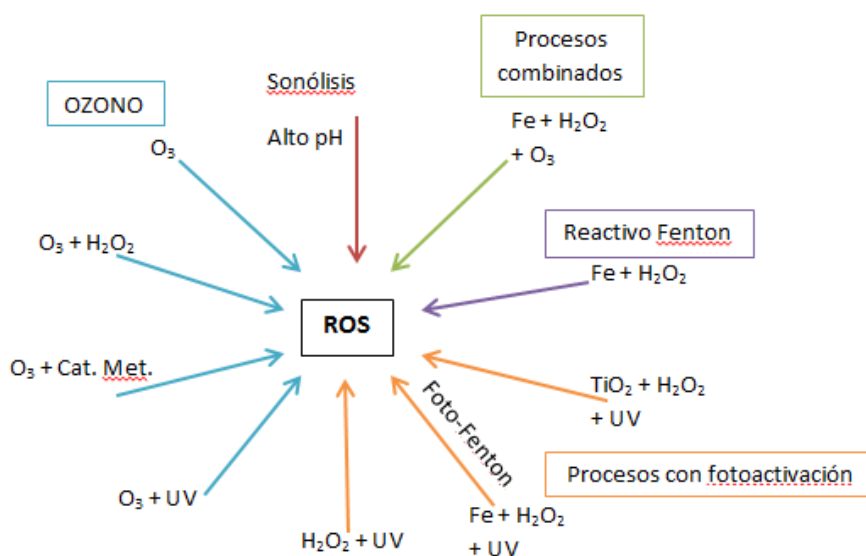


Figura 3. Principales procesos de oxidación avanzada (POAs).

La principal desventaja de los tratamientos de oxidación avanzada es su alto coste en cuanto a los reactivos (por ejemplo el H_2O_2) y/o la generación de irradiación UV u ozono.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), son las responsables de la degradación fotocatalítica de muchos compuestos orgánicos (Bekbolet y Araz, 1996). En un proceso fotocatalítico, el semiconductor, se excita absorbiendo la luz y favoreciendo la producción de estas especies reactivas del oxígeno a partir del agua y el oxígeno presente. Estas especies son altamente

oxidantes y no selectivas (Wang et al., 2015), las cuales se aplican en la inactivación de microorganismos patógenos.

Las principales ROS generadas son los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que son los responsables de la inactivación bacteriana, pero también se producen otros tales como el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidropéroxido (HO_2^{\bullet}) y moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que contribuyen en el proceso biocida (Sixto Malato et al., 2015).

Entre los tratamientos de oxidación avanzada, destaca la fotocatálisis heterogénea con dióxido de titanio en suspensión o inmovilizado como catalizador, debido fundamentalmente a que es un semiconductor con baja toxicidad, resistencia a la fotocorrosión, disponibilidad, efectividad y relativo bajo coste (Blanco et al., 2001; Byrne et al., 2011; Gelover et al., 2006).

2.2.3. Fotocatálisis con dióxido de titanio

El proceso de fotocatálisis heterogénea mediante UV-VIS consiste en hacer uso de la banda cercana a la ultravioleta del espectro solar para excitar al catalizador. El catalizador utilizado en este trabajo es el dióxido de titanio, que en medio acuoso y en presencia de luz solar es capaz de excitarse, con una energía equivalente al salto energético. De esta forma los electrones de la banda de valencia migran a la banda de conducción dejando su correspondiente hueco en la banda de valencia, y generándose los denominados pares hueco-electrón (h^+e^-) (Ecuación 1). En la Figura 4 se muestra un esquema del mecanismo de activación fotoinducida del TiO_2 .

La energía necesaria para excitar el dióxido de titanio es de 3,2 V y como consecuencia sólo es capaz de absorber luz ultravioleta ($\lambda < 385 \text{ nm}$). Los pares hueco-electrón pueden recombinarse o bien desplazarse a la superficie de catalizador. Para que no se produzca la recombinación de los pares h^+e^- es importante que exista un oxidante que actúe como aceptor de electrones. Generalmente este papel lo desempeña el O_2 produciéndose el ion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Ecuación 2).

Por otro lado, moléculas de agua son adsorbidas en los huecos produciéndose radicales hidroxilo, $\bullet\text{OH}$ (Ecuación 5). También se puede producir la oxidación de una molécula M (por ejemplo un contaminante orgánico, R-X) adsorbida en los huecos mediante transferencia de electrones, tal y como se muestra en la Figura y Ecuación 6 (Oppenländer, 2003).

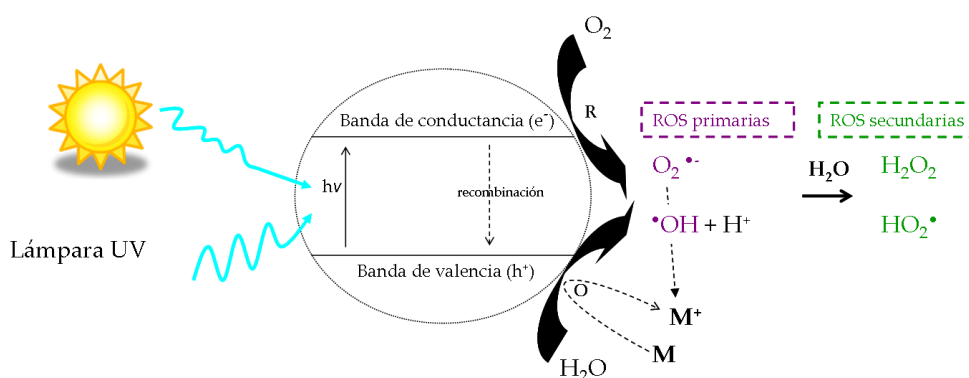
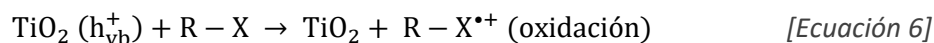
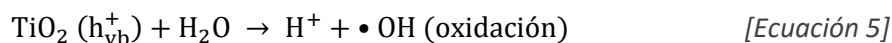
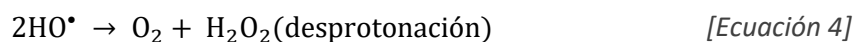
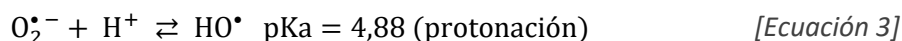
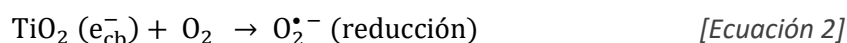
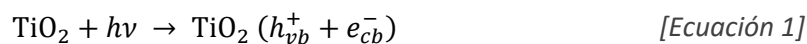


Figura 4. Mecanismo de activación fotoinducida del dióxido de titanio con presencia de contaminantes (M) (Oppenländer, 2003).



El daño oxidativo inicial en la bacteria tiene lugar en la pared celular y después de la eliminación de esta protección, los radicales atacan la membrana citoplasmática. Progresivamente, aumenta la permeabilidad de la membrana permitiendo la liberación del contenido intracelular. La rápida pérdida de iones potasio genera una reducción de la viabilidad celular, desequilibrando las funciones vitales y provocando la muerte de la bacteria (Chong et al., 2010).

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTO DE DATOS

3.1. Metodología analítica

3.1.1. Determinación de parámetros físico-químicos

En la Tabla 2 se muestran los parámetros físico-químicos analizados, los métodos analíticos y la instrumentación utilizada para la caracterización de las muestras de agua.

Tabla 2. Métodos analíticos e instrumentación.

Parámetro	Método	Equipo	Marca y modelo	Rango	Error
pH	4500-HB Standard Methods	pH-metro	CRISON GLP 21	ene-14	±0,02
Turbidez	UNE-EN ISO 7027	Turbidímetro	HANNA Instruments LP 2000	0-1000 UNT	± 0,5 UNT
Conductividad	UNE-EN ISO 2788	Conductímetro	CRISON Basic 30	0,01-19999 μS/cm	± 0,02 μS/cm
Sólidos en suspensión totales (SST)	2540D <i>Standard Methods</i>	Espectrofotómetro	Hach LANGE DR 2800	5-750 mg/L	±0,1 mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO)	410.EPA (adaptado)	Fotómetro multiparámetro de sobremesa	HANNA Instruments HI 83099	0-150 mg/L	±1 mg/L
		Reactor de DQO	HANNA Instruments HI 839800	-	-
Carbono orgánico total	5310-B Standard Methods	Analizador de TOC	SHIMADZU, TOC-Vcsh	CT: 0 a 25000mg/L CIT: 0 a 30000 mg/L	5-10%

En el Anexo I se desarrolla de manera más detallada la metodología y la instrumentación utilizada.

3.1.2. Determinación de parámetros microbiológicos

Los indicadores bacterianos de contaminación fecal objeto de estudio en el presente proyecto son *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* El cultivo y recuento de estas bacterias se realiza siguiendo el procedimiento descrito en las Normas Españolas UNE-EN ISO 9308-1:2014 “Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes” y UNE-EN ISO 7899-2:2001 “Detección y recuento de enterococos intestinales” y el método normalizado, Standard Methods 9215.C, de siembra en superficie (Eaton et al., 2005).

Medios de cultivo

El cultivo de los indicadores fecales que se estudian en este proyecto se realiza en dos medios de cultivo selectivos diferentes:

- *Escherichia coli*: agar MacConkey (Scharlau). En este medio, las colonias de *E. coli* adquieren un color violeta oscuro característico en este agar como se observa en la Figura 5.a.
- *Enterococcus sp.*: agar Slanetz & Bartley (Scharlau). En este medio, las colonias de *Enterococcus sp.* adquieren un color marrón oscuro, como se observa en la Figura 5.b.

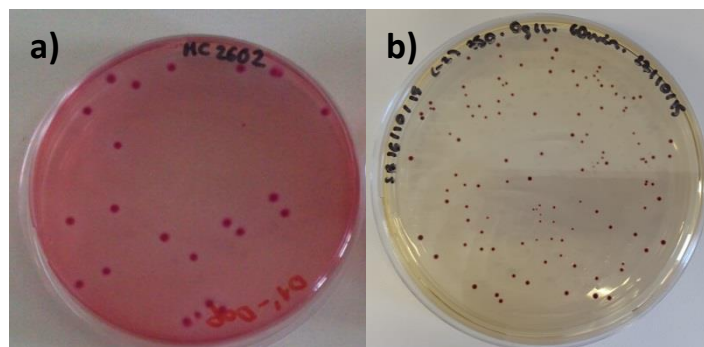


Figura 5. a) Colonias de *E. coli* en agar MacConkey, b) Colonias de *Enterococcus sp.* en agar S&B.

Para el cultivo de cepas puras de ambos tipos de bacterias se utiliza Agar Nutritivo (Scharlau) tal y como se describe en el Anexo II.

Métodos de siembra

En este estudio se realiza el método de siembra en superficie, Standard Methods 9215.C (Eaton et al., 2005), y el método de filtración por membrana, UNE-EN ISO 9308-1:2014 para *E. coli* y UNE-EN ISO 7899-2:2001 para *Enterococcus sp.*

El método de filtración se utiliza cuando la población bacteriana es inferior a 10^4 UFC/100ml, mientras que el método de siembra en superficie se utiliza cuando la población es de 10^3 UFC/100ml. Además, para analizar un volumen de muestra que permita un recuento adecuado de colonias en el método de siembra en superficie, se realizan diluciones decimales seriadas. En el Anexo II se describen los métodos de siembra y el método de diluciones seriadas en mayor profundidad.

Incubación

Tras realizar la siembra, las placas se invierten y se introducen en la estufa incubadora a 42°C y durante 21 ± 3 horas para el caso de *E. coli* y a 37°C durante 44 ± 4 horas en el caso de *Enterococcus sp.* Tras finalizar la incubación se cuentan las colonias que presenten la coloración indicada por el medio de cultivo selectivo.

Recuento

El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para formar una sola colonia, pero esto no siempre es cierto porque con frecuencia las bacterias crecen unidas en cadena o agrupadas. Además no todas las células bacterianas son capaces de formar colonias, ya que no crecen en los medios de cultivo. Es por esto que en el recuento en placa lo más correcto es hablar de unidades formadoras de colonias (UFC) (Gamazo et al., 2005). Los datos de los diferentes experimentos realizados se indican en UFC/100 ml.

En los métodos de recuento en placa es recomendable que el número de colonias que crezcan en las placas no sea demasiado grande, pues en estas condiciones las colonias se fusionan entre sí y dan lugar a estimaciones erróneas, ni tampoco demasiado bajo para que el resultado pueda ser representativo. En el método de filtración por membrana se cuentan las placas cuyo número de colonias se encuentra entre 10 y 150. En el método de siembra en superficie se cuentan las placas con un número de colonias entre 10 y 300 (Eaton et al., 2005). Para obtener el número apropiado de colonias se diluye la muestra utilizando el método de diluciones decimales seriadas, como se explica en el Anexo II. Cuando no se detecta ningún microorganismo en las placas sembradas, se considera 1 UFC en 100µl de la disolución madre para poder realizar los cálculos logarítmicos posteriores.

Tras seleccionar las placas con crecimiento adecuado, el recuento bacteriano se obtiene aplicando la Ecuación 1, donde F_d es el factor de dilución, es decir, la inversa de la dilución seleccionada.

$$UFC/100\text{ ml} = UFC/ml\text{ muestra analizados} \cdot F_d \cdot 100\text{ ml} \quad [\text{Ecuación 7}]$$

Equipos utilizados en el análisis microbiológico

Los equipos empleados para el análisis de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* se muestran en la Tabla 3. Todo el material de vidrio utilizado se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 bar de presión durante 15 minutos.

Tabla 3. Equipos utilizados en el análisis microbiológico

Instrumento	Marca	Modelo	Función
Estufas de cultivo	J.P. Selecta	INCUDIGIT 36 L	Cultivo bacteriológico
Baño termostático	J.P. Selecta	PRECISTEM 20 L	Mantenimiento de medio de cultivo en estado líquido
Autoclave	J.P. Selecta	41758	Esterilización del material
Rampa de filtración	Millipore	Sistema Microfil	Análisis microbiológico
Agitador Vortex	Velp Scientifica	ZX3	Mezcla de soluciones en tubos
Mechero Bunsen			Crear condiciones de esterilidad
Cabina de flujo laminar	Cruma	670FL	Atmósfera estéril
Contador de colonias	Intescience	Scan 100	Recuento de placas

3.2. Muestras

En este trabajo se utilizan tres tipos de matrices, una suspensión bacteriana (SB) al 0,9% de NaCl, agua de salida de distintas depuradoras situadas en la cuenca hidrográfica del Ebro (EDAR) y agua de salida de EDAR autoclavada y fortificada (EDAR+SB). A continuación se describen las características de cada una de ellas.

3.2.1. Suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl

Estas muestras se preparan a partir de agua ultrapura a la que se le añade NaCl al 0,9% (solución salina) en botellas de vidrio de 1L trabajando en ambiente estéril para evitar posibles contaminaciones posteriores. El NaCl es una sal muy usada en diversos estudios porque mantiene el equilibrio osmótico de las células (Velasco et al., 2013). Tras la preparación y agitación para homogeneizar el contenido, se meten a un autoclave para esterilizarlas y eliminar así cualquier contaminante microbiológico que pudiera haber.

Tras la esterilización de las muestras, se aumenta artificialmente la población de *Escherichia coli* y *Enterococcus sp.* a partir de cultivos puros de estas bacterias hasta tener una concentración de 10^7 - 10^8 UFC/100 ml para *E. coli* y 10^7 - 10^8 UFC/100 ml para *Enterococcus sp.* Este proceso se denomina fortificación de las muestras y se explica más en detalle en el Anexo II.

3.2.2. Agua de salida de EDAR

Las muestras de agua de salida de depuradora fueron cogidas desde el 16/09/2015 hasta el 29/02/16 de cuatro estaciones diferentes de Navarra situadas en la cuenca hidrográfica del río Ebro. Las características físico-químicas y el contenido bacteriano de estas muestras se presentan en la Tabla 4. Dichas muestras contienen una concentración de *E. coli* de 10^4 a 10^6 UFC/100 ml y de *Enterococcus sp.* de 10^2 a 10^5 CFU/100ml. Además, la muestra 3 de agua de salida de depuradora (Tabla 4) fue autoclavada y fortificada con una suspensión bacteriana de *E. coli* para obtener una concentración de 10^7 - 10^8 CFU/100 ml.

Tabla 4. Resultados de caracterización físico-química de las muestras utilizadas en este estudio.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EDAR	Corella	Corella	Corella	Cintruenigo	Monteagudo	Tudela	Tudela	Tudela	Tudela
Tipo de muestra	EDAR	EDAR	EDAR+SB	EDAR	EDAR	EDAR	EDAR	EDAR	EDAR
pH	7,6	7,9	7,7	7,4	7,7	7,4	8,4	7,6	7,9
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1339	1091	896	1400	1100	1169	1063	1207	897
Turbidez (NTU)	2	3	3	21	19	47	15	22	15
SS (mg/l)	9	10	10	43	24	47	16	23	20
COT (mg C/l)	10,9	10,2	9,9	24,2	27,5	47,3	37,6	40,0	43,5
DQO (mg O ₂ /l)	16	46	25	125	40	40	50	58	30
<i>E. coli</i> (UFC/100ml)	4,20E+04	1,00E+05	6,70E+08	4,00E+06	5,00E+05	3,00E+05	6,00E+04	6,00E+05	3,50E+04
<i>E. coli</i> Log(UFC/100ml)	4,6	5,0	8,8	6,6	5,7	5,5	4,8	5,8	4,5
<i>Enterococcus</i> (UFC/100ml)	-	-	-	4,60E+04	5,80E+05	3,90E+04	8,50E+02	1,10E+05	3,50E+03
<i>Enterococcus</i> Log(UFC/100 ml)	-	-	-	4,7	5,8	4,6	2,9	5,0	3,5

3.3. Materiales e instrumentación en tratamientos fotocatalíticos

3.3.1. Dióxido de titanio

En este trabajo se utiliza como catalizador una suspensión en agua de nano-TiO₂ y aglutinantes inorgánicos (100-150 g/l) comercializado por Levenger.

La superficie fotocatalítica del TiO₂ tiene una durabilidad aceptable y buena resistencia. Este catalizador se utiliza en construcción como pavimento para reducir la polución de las emisiones de los vehículos, como elemento decorativo en lugares que reciben luz solar. No solo inhibe la reproducción de las bacterias sino que a su vez descompone las paredes celulares (Spasiano et al., 2015).

Se analiza la composición mediante Fluorescencia de Rayos X y Microscopía Electrónica de forma semicuantitativa y los resultados expresan que además del TiO₂, en la suspensión también hay otros elementos como Ca, Mg, Zn, Cu, S, Na, Al.

Mediante Difracción de Rayos-X se analiza la presencia de fases cristalinas del TiO₂ y los resultados son 84% de Anatasa y 7% Rutilo. También contiene otros componentes como Gypsum (5%) y ZnCO₃ (3%).

Además, mediante esta misma técnica se determina el tamaño medio de partícula y el resultado es de 22 nm para Anatasa y 34 nm para Rutilo.

3.3.2. Equipos

En los experimentos realizados se emplea como fuente de irradiación una cámara solar Atlas Suntest CPS+/XLS+. En la Figura 6 se muestra dicho equipo.



Figura 6. Cámara solar.

La cámara está equipada con una lámpara de Xenón que emite luz a una longitud de onda entre 290 y 800 nm, simulando la luz solar natural. La emisión del rango de radiación necesario (radiaciones UVA y visible) se consigue mediante dos filtros que cubren la lámpara, uno de cuarzo y otro adicional de ventana (Xenochrome 320). En la Figura 7 se representa el espectro de la radiación ultravioleta emitida por el equipo. El filtro de ventana intercepta las longitudes de onda por debajo de los 320 nm, eliminando el rango UVB; de esta forma se evita que las radiaciones UVB y UVC causen la inactivación directa de las bacterias. Además, se puede regular la intensidad de 250 a 750 W/m² y controlar la temperatura.

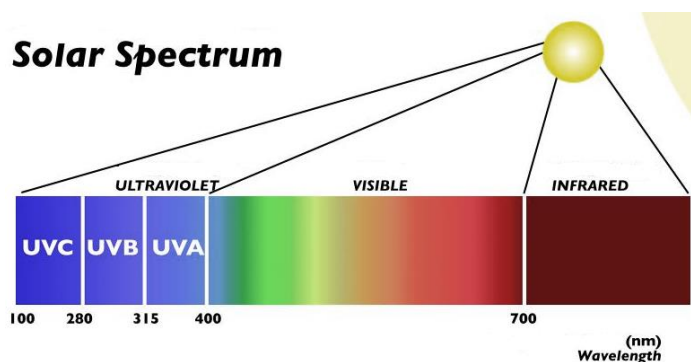


Figura 7. Espectro de la radiación solar.

3.4. Procedimiento general en tratamientos de fotocátalisis

Los tratamientos de desinfección estudiados se basan en la aplicación de luz UVA-visible (fotólisis) y de UVA-visible catalizada con dióxido de titanio (fotocatálisis).

Las intensidades de irradiación utilizadas son de 250 W/m², 500 W/m² y 750 W/m². La intensidad de 500W/m² corresponde al 50% de la intensidad de la radiación solar natural ecuatorial a medio día (Lanao et al. , 2012; Rodríguez-Chueca et al., 2012).

La temperatura máxima que se alcanza es de 35°C, fijado mediante el controlador de temperatura para evitar la inactivación de las bacterias por estrés térmico. Se realizan experimentos a tres temperaturas diferentes con el fin de reproducir las condiciones ambientales naturales:

- Baja Tª: 10 ±3°C. Estos experimentos se realizan con un baño de hielo en el exterior
- Media Tª: 21 ±3°C. Estos experimentos se realizan con un baño de hielo en el interior del laboratorio
- Alta Tª: 33 ±3°C

Para realizar los ensayos se vierten 100 ml de muestra en reactores de vidrio borosilicatado (Pyrex) de 250 ml que permite el paso de la radiación UVA. Estos reactores se colocan en el interior de la cámara solar con un agitador magnético, cuya función es proporcionar un medio aireado y una mezcla perfecta durante los experimentos. Previamente, se añade la dosis de TiO₂ requerida que varía desde 0,5 g/L a 2g/L, rango de dosis establecidas por ser cercanas a las consideradas óptimas por algunos investigadores (Cho et al., 2004; Rincón et al., 2003).

Los tiempos de tratamiento varían entre 2 y 120 minutos, intervalo usado por diferentes autores en sus estudios (Rincón et al., 2007).

Como parámetros de control se miden el pH y la conductividad de las muestras antes y después del tratamiento. Para evaluar la eficacia de los tratamientos aplicados en la desinfección de una muestra se calcula la inactivación bacteriana. Para ello, se utiliza la Ecuación 8, donde N₀ es la población bacteriana inicial y N_t la población que sobrevive al tratamiento de un determinado tiempo t, ambos parámetros medidos en UFC/100 ml.

$$\text{Inactivación bacteriana} = \text{Log} \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \quad [\text{Ecuación 8}]$$

3.5. Diseño de experimentos y análisis estadístico de variables influyentes

El diseño de experimentos y el posterior análisis de los resultados se realiza con la ayuda de la versión para Windows de Satatgraphics® 5.1. Este software permite realizar diseño de experimentos factorial, conocido como diseño 2^k en el que cada variable adopta dos valores o niveles. Esta técnica resulta muy útil en el estudio de experimentos con múltiples variables, permitiendo ver cómo se comportan de forma independiente y de forma combinada (Lanao et al., 2012; Rodríguez-Chueca et al., 2012). El intervalo de confianza establecido es del 95% para los resultados de todos los tests aplicados, que se corresponde con un valor de significación de 0,05 (p-valor).

Se realiza un diseño experimental factorial en matriz de suspensión bacteriana de *E. coli* o *Enterococcus sp.* Las variables seleccionadas son presencia de TiO_2 , tiempo de tratamiento, intensidad y temperatura. Los niveles utilizados para cada una de las variables seleccionadas se describen a continuación:

- Dióxido de titanio: se analiza la dosis de 0g/L (ausencia) frente a 1g/L.
- Tiempo de tratamiento: se analizan tratamientos de 10 minutos de duración frente a tratamientos de 60 minutos.
- Intensidad de irradiación: se analiza una intensidad de 250 W/m^2 frente a una de 750 W/m^2 .
- Temperatura: se analiza una temperatura media de 10°C frente a una de 33°C .

Se utilizan dos tipos de representaciones a partir del análisis de los resultados obtenidos:

Diagrama de Pareto: representa las variables e interacciones más importantes en el proceso a nivel estadístico sobre el factor respuesta, representando gráficamente las estimaciones de cada efecto en orden decreciente. Se considera que un efecto es significativo cuando sobrepasa la línea discontinua dibujada en el diagrama, y que se obtiene con el cálculo del margen de error simultáneo.

Gráfica de efectos principales: se estima el efecto de cada variable sobre el factor respuesta y se representa la media de la inactivación obtenida para cada variable y para cada uno de los dos niveles seleccionados. La pendiente de la recta obtenida para cada variable es indicativa de la influencia de dicha variable sobre el factor respuesta. A mayor pendiente, la influencia sobre el factor respuesta es más importante.

Gráfica de interacciones entre variables: una gráfica de interacción muestra el impacto que tiene el cambio de la configuración de un factor sobre otro factor. Debido a que una interacción puede aumentar o disminuir los efectos principales, la evaluación de las interacciones es extremadamente importante. Se considera que una interacción entre dos variables es poco significativa cuando su representación en la gráfica es de líneas paralelas o casi paralelas. En cambio, la interacción entre las variables se aprecia cuando las líneas se cortan o tienen tendencia a cortarse.

3.6. Modelización cinética de inactivación bacteriana

La microbiología predictiva se utiliza para conocer la respuesta de las poblaciones de microorganismos frente a diversas condiciones ambientales o tratamientos. Generalmente las curvas de inactivación microbiana presentan una de las formas descritas en la Figura 8.

Los modelos cinéticos de inactivación microbiana son modelos matemáticos que estudian el ritmo de mortandad de las poblaciones bacterianas a lo largo de un proceso. Mediante la modelización cinética se pretende obtener una expresión matemática que facilite el diseño adecuado de un sistema de desinfección.

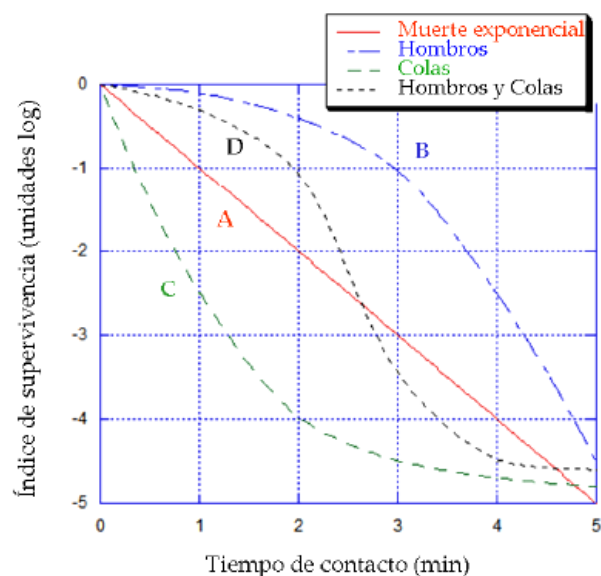


Figura 8. Curvas de inactivación microbiana (Gyürek et al., 1998).

En las curvas de tipo A, también denominadas de muerte exponencial o de primer orden, la velocidad de inactivación es constante e independiente del tiempo de tratamiento. Otro tipo de curvas son las de tipo B o curvas de hombro. Tal y como se observa en la Figura 8, este tipo de curvas de inactivación muestran un fenómeno de hombro inicial (shoulder) en la que una fracción de los microorganismos se mantienen constantes en los primeros instantes del tratamiento hasta un determinado punto a partir del cual se produce un descenso lineal de los mismos. Este tipo de comportamiento en la inactivación puede deberse a diversos factores como por ejemplo, una mezcla inadecuada del desinfectante en la muestra, un retraso en la difusión del desinfectante a los puntos de acción bacterianos o a una resistencia inicial de los microorganismos al ataque del desinfectante. Por otro lado las curvas de tipo C o curvas con colas, presentan un comportamiento totalmente opuesto al descrito en las B. Estas curvas se caracterizan por una fase de inactivación lineal rápida seguida de una disminución lenta de la población bacteriana (Gyürek et al., 1998).

Para estudiar la reducción bacteriana en los ensayos de oxidación, se analizan las cinéticas con los resultados obtenidos en las matrices de suspensión bacteriana al 0,9% NaCl tanto con *E. coli* como con *Enterococcus sp* (Apartado 3.2.1).

La Tabla 5 recoge los modelos matemáticos propuestos para describir las gráficas de inactivación obtenidas en el presente trabajo de investigación. En el Anexo IV se desarrolla con más detalle cada uno de los modelos matemáticos seleccionados.

Tabla 5. Modelos cinéticos de inactivación bacteriana aplicados.

Modelos cinéticos	Ecuaciones integradas	Coefficientes cinéticos	Referencias
Hom	$\text{Log}(N_t/N_0) = -k \cdot C^m \cdot t^m = -k_{ap} \cdot t^m$	k_{ap}, m	(Hom, 1972)
Bifásico	$\text{Log } N_t/N_0 = \text{Log}[P \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - P) \cdot e^{-k_2 \cdot t}]$	p, k_1, k_2	(Pruitt, et al., 2007)
Weibull	$\text{Log } N_t/N_0 = -(t/\delta)^p$	δ, p	(Mafart, et al., 2002)

Para calcular los coeficientes cinéticos de cada modelo y tratamiento se utiliza la herramienta Solver del programa Excel (Microsoft).

La calidad de los ajustes de los modelos a los datos experimentales obtenidos se evalúa mediante dos índices: el coeficiente de regresión (R) (Ecuación 9) y el error cuadrático medio (ECM) (Ecuación 10), y mediante la representación gráfica de los valores estimados frente a los obtenidos experimentalmente. El cálculo de estos parámetros, R y ECM, se realiza con el programa Excel (Microsoft).

$$R = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad [\text{Ecuación 9}]$$

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2}{n}} \quad [\text{Ecuación 10}]$$

3.7. Ensayos de reutilización del TiO₂ en discontinuo

Se realizan ensayos de reutilización del TiO₂ para analizar la pérdida de eficacia del catalizador con el uso.

Para ello, los ensayos de oxidación se realizan con las muestras de agua sintética (Apartado 3.2.1). Se añade una dosis de 1 g/L a 200 ml de muestra en un reactor Pyrex y se irradia con luz UVA-visible con una intensidad de 500 W/m² durante 15 minutos.

Después del tratamiento, se analiza la concentración de bacterias supervivientes y el resto de muestra tratada se deja sedimentar durante 24 horas en ausencia de luz. Tras este periodo de tiempo se separa la muestra líquida y se deja en el recipiente el dióxido de titanio sedimentado. Por último, se adiciona el mismo volumen de nueva muestra (200 ml de agua sintética) al recipiente con el catalizador y se mide la turbidez para comprobar que la muestra tiene la misma concentración de TiO₂.

Se analiza la concentración de microorganismos de la nueva muestra inicial y se repite el proceso, tal y como se indica en la Figura 9.

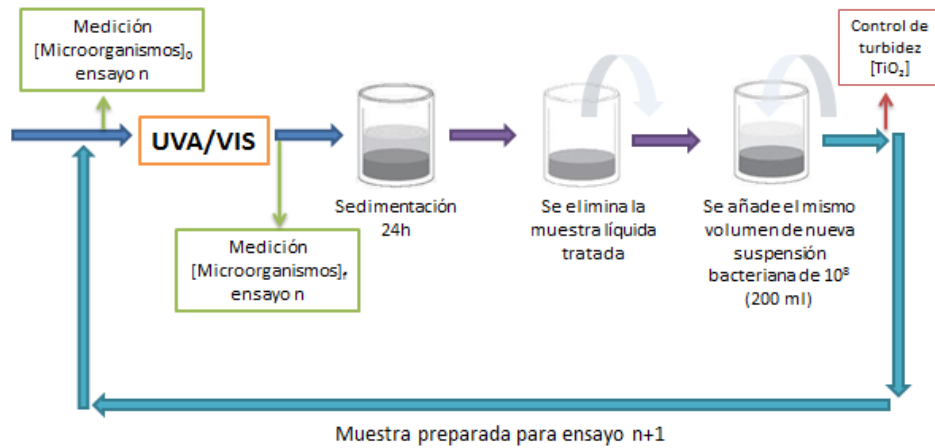


Figura 9. Procedimiento de reutilización.

3.8. Ensayos de recrecimiento bacteriano

Se realizan ensayos para estudiar la eficacia de la desinfección y comprobar si se produce recrecimiento bacteriano una vez finalizada la irradiación UVA-visible. El contacto de las bacterias con el TiO_2 puede afectar a la permeabilidad de la membrana y acabar dañando todo el tabique celular. Algunos iones y proteínas pueden salir del interior de la célula y se produce la degradación de los componentes internos provocando su muerte, por lo que el daño sería irreversible. Pero si esto no fuera así, podría recrecer (Foster et al., 2011). En la Figura 10 se muestran unas imágenes de TEM estudiadas por (Nesic et al., 2014) en las que se observa la interacción entre el TiO_2 y la pared celular de *E. coli*.

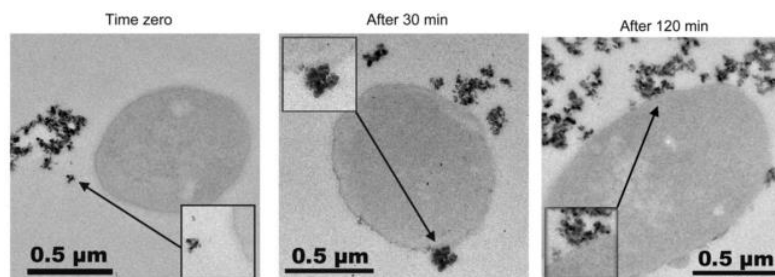


Figura 10. Imágenes TEM de interacción de TiO_2 con la pared celular de *E. coli* como una función del tiempo en oscuridad. (Nesic et al., 2014)

Tal y como comentan los autores en la Figura 10 se observa a los 120 minutos la extensión del daño en la pared celular. Este hecho va acompañado de la total pérdida de reproducción en la oscuridad. Para ello, se toma la muestra líquida sobrenadante que se separa tras la sedimentación del dióxido de titanio y se analiza su concentración bacteriana tras las 24 horas para comprobar su evolución.

La duración de la desinfección es evaluada en términos de tiempo de desinfección (EDT_{24}), que es definido como el tiempo requerido para la inactivación total de las bacterias sin que exista recrecimiento en ausencia de luz y en un periodo de 24 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de las variables influyentes en los tratamientos

4.1.1. Estudio de la influencia de la dosis de TiO_2 y del tipo de bacteria

La Figura 11 muestra el efecto de la dosis de TiO_2 en la desinfección bacteriana en una suspensión bacteriana fortificada con *E. coli* y otra con *Enterococcus sp.* Los ensayos se realizan durante 10 minutos, con una intensidad de 500 W/m^2 y una temperatura media de 25°C .

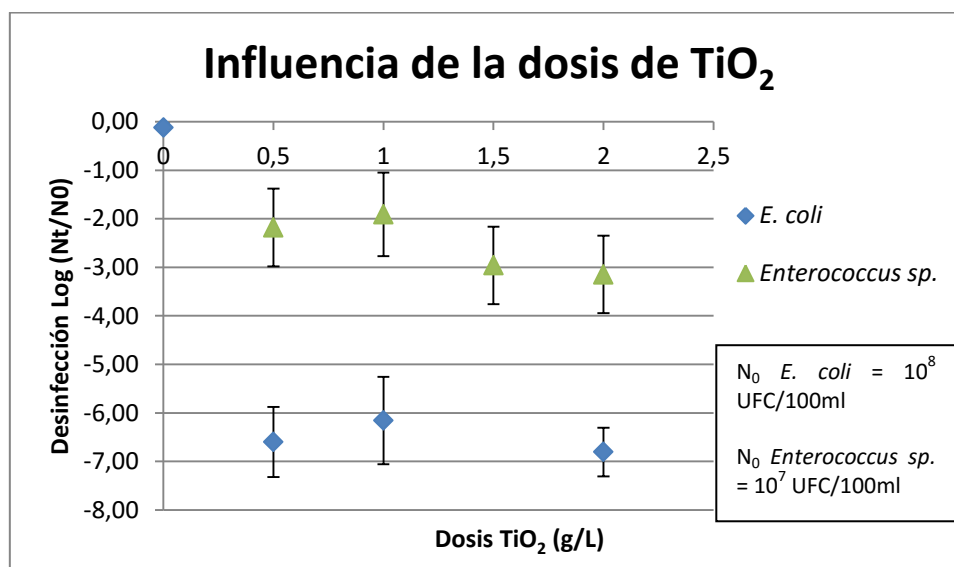


Figura 11. Influencia de la dosis de TiO_2 en la desinfección bacteriana de *E. coli* y *Enterococcus sp.*

En la Figura 11 se observa un aumento de la inactivación al aumentar la dosis de catalizador para un rango de 0 a 2 g/L. En el caso de *E. coli* se observa un aumento de la desinfección para una dosis de 0,5 g/L de TiO_2 pero a partir de esta dosis no se experimentan cambios. Otros autores sostienen que cuando se aumenta la dosis de dióxido de titanio se obtiene mayor reducción bacteriana (Bekbolet, et al., 1996; Chen, et al. 2010; Fernández-Ibáñez et al., 2014; Gelover, et al., 2006).

Además, se obtiene que, tal y como se comenta en el Apartado 2.1, *Enterococcus sp.* es más resistente a la desinfección que *Escherichia coli* para las mismas condiciones de operación. Resultados que respaldan otros autores en sus estudios (van Grieken et al., 2010; Rincón et al., 2004).

4.1.2. Estudio de la influencia del tiempo de tratamiento

La Figura 12 muestra el efecto del tiempo de tratamiento sobre la desinfección bacteriana en una suspensión bacteriana fortificada con *E. coli* y una suspensión bacteriana (SB) fortificada con *Enterococcus sp.* Para la obtención de estos resultados se emplean unas concentraciones de 0 y 1 g/L de TiO_2 , una intensidad de 500 W/m^2 y una temperatura media de 25°C .

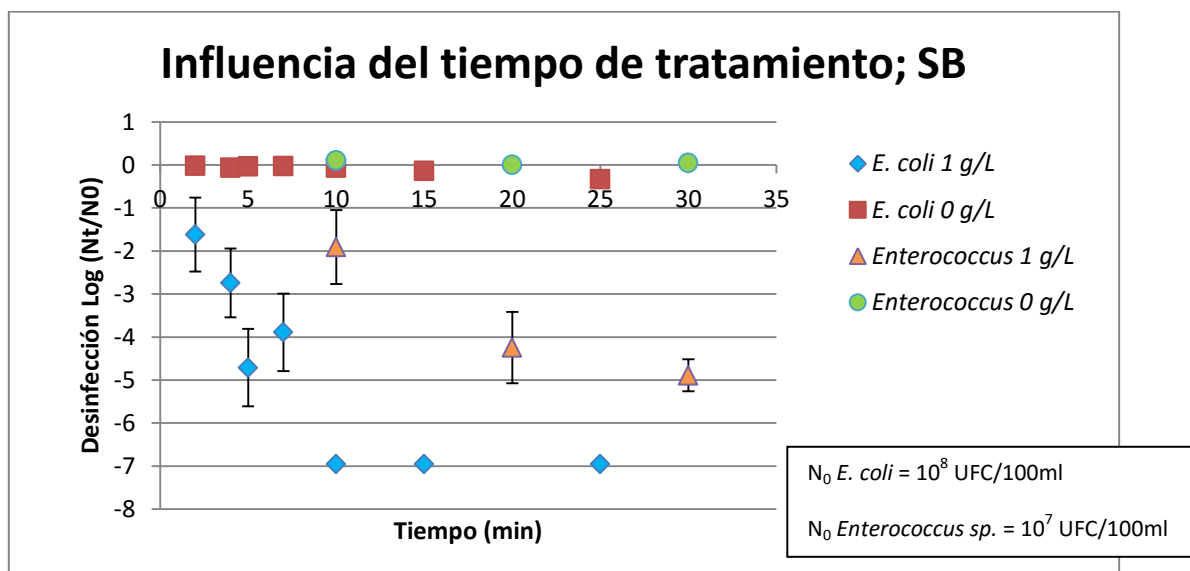


Figura 12. Influencia del tiempo en el tratamiento de desinfección de *E. coli* y *Enterococcus sp.*

Tal y como se observa en la Figura 12, si no se aplica TiO_2 , no se consigue desinfección. En el caso de *Enterococcus sp.* con 1 g/L de catalizador, se observa un aumento de la desinfección conforme aumenta el tiempo de tratamiento. En el caso de *E. coli* con un tratamiento de 10 minutos con 1 g/L de TiO_2 se llega a la total eliminación de dicha bacteria, alcanzando su límite de detección.

Las Figuras 13 y 14 muestran los resultados obtenidos en la inactivación de *Escherichia coli* presente en agua de salida de depuradora (EDAR, números 4, 5, 6 y 7 de la Tabla 4). Las condiciones de operación son:

- Tiempo: 60 y 120 minutos
- Dosis de TiO_2 : 0 y 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m^2
- Temperatura media

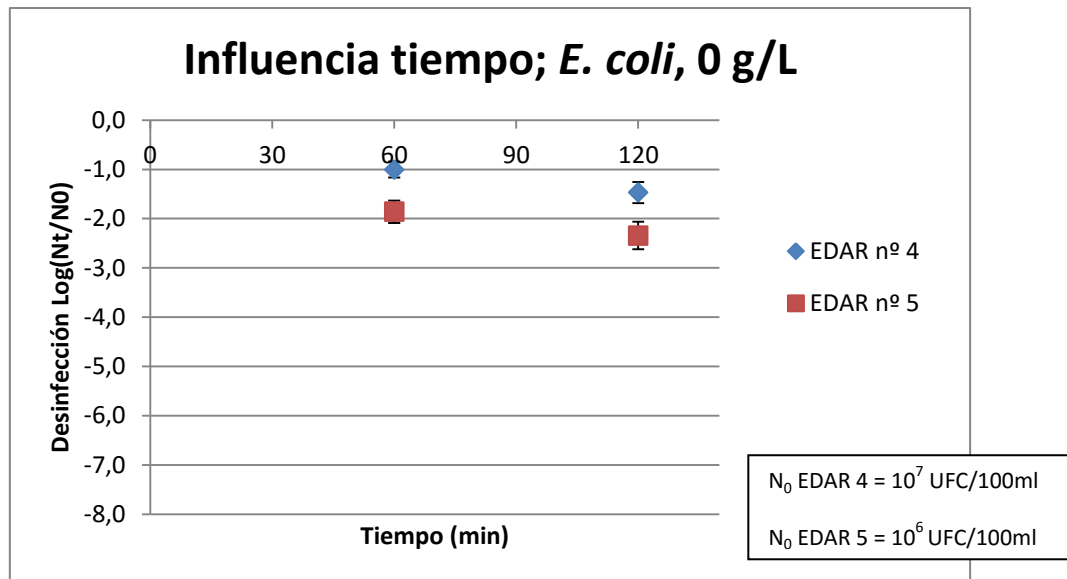


Figura 13. Influencia del tiempo en la inactivación de *E. coli* en matriz de EDAR sin TiO_2 .

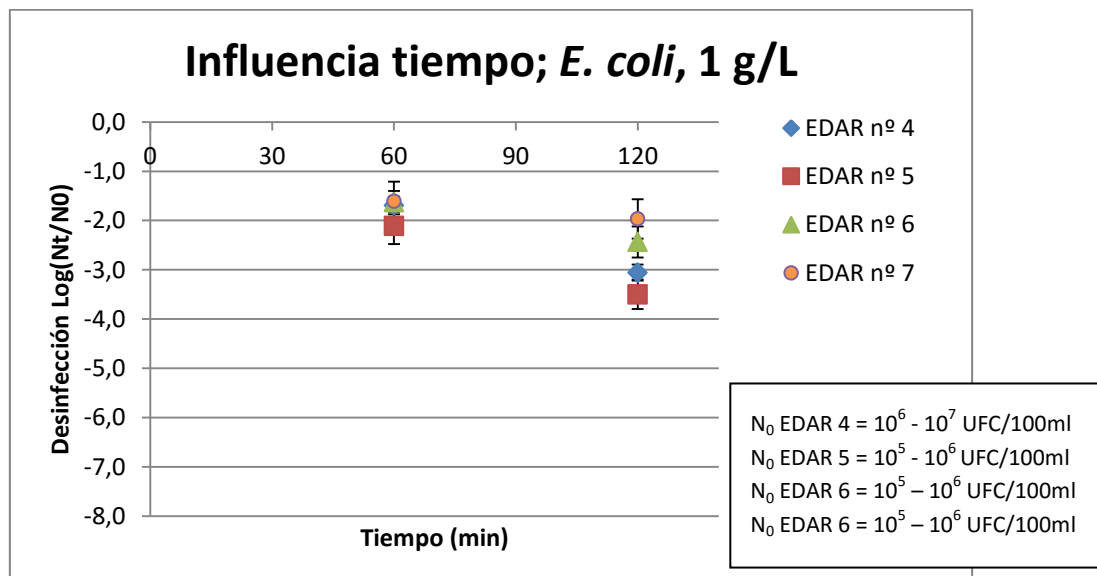


Figura 14. Influencia del tiempo en la inactivación de *E. coli* en matriz de EDAR con TiO_2 .

En las Figuras 13 y 14 se observa que cuando aumenta el tiempo de tratamiento, aumenta la inactivación de *E. coli* en estas muestras de salida de depuradora (números 4, 5, 6 y 7 de la Tabla 4).

De igual modo que para *Escherichia coli*, se realizan experimentos con las mismas condiciones de operación, utilizando las mismas matrices pero estudiando la reducción de *Enterococcus sp.* Las Figuras 15 y 16 muestran los resultados obtenidos en estos ensayos.

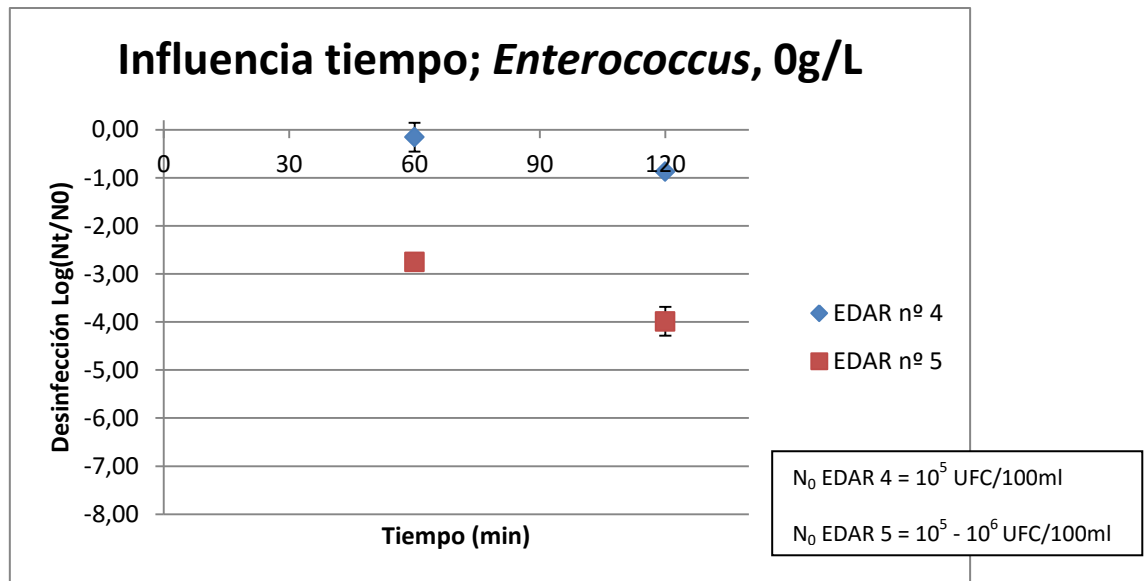


Figura 15. Influencia del tiempo en la inactivación de *Enterococcus* en matriz de EDAR sin TiO_2 .

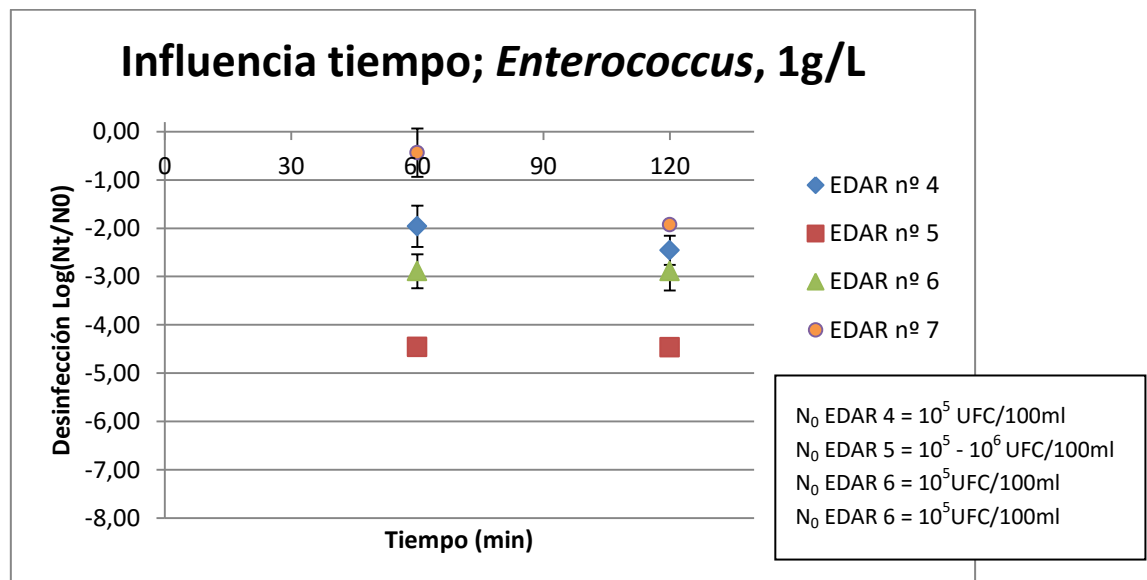


Figura 16. Influencia del tiempo en la inactivación de *Enterococcus* en matriz de EDAR con TiO_2 .

En la Figura 15 se observa que cuando aumenta el tiempo aumenta la inactivación bacteriana, mientras que en la Figura 16, con el uso del catalizador, no se aprecian diferencias significativas con el aumento del tiempo excepto en la muestra de EDAR nº 7.

4.1.3. Estudio de la influencia de la intensidad de tratamiento

En la Figura 17 se presenta el gráfico de estudio del efecto de la intensidad en la inactivación de *E. coli* y de *Enterococcus sp.* en suspensiones bacterianas al 0,9% NaCl. Se realizan los ensayos durante 10 minutos, con una temperatura media de 22°C, con y sin dióxido de titanio. Las intensidades empleadas son 250, 500 y 750 W/m².

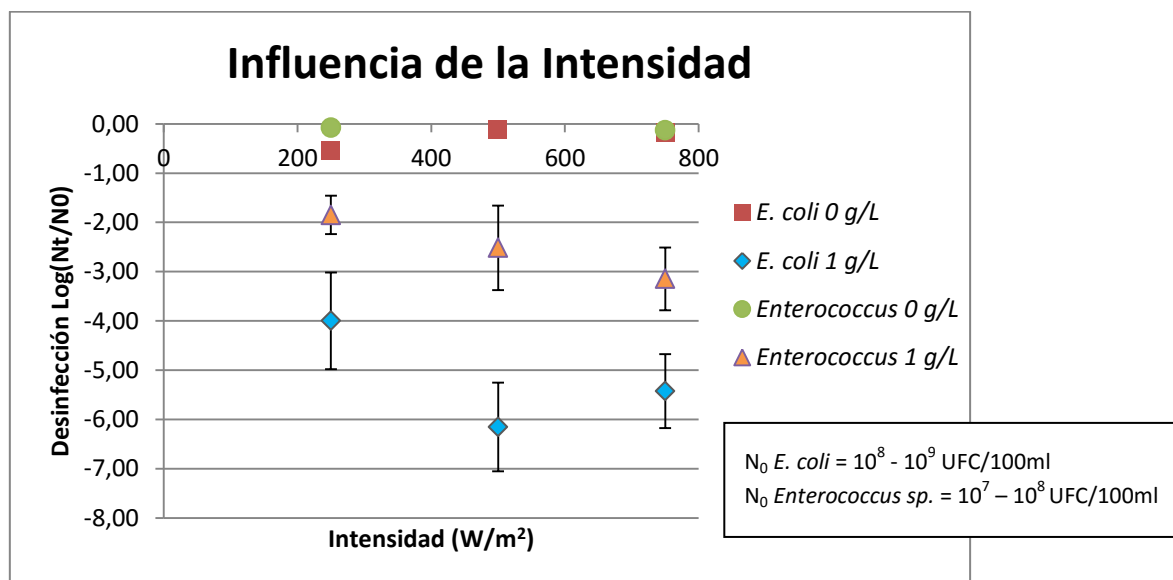


Figura 17. Influencia de la intensidad sobre la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* en suspensiones bacterianas de 0,9% NaCl.

Como se observa en la Figura 17, hay una clara tendencia a que al aumentar la intensidad, aumenta la desinfección para ambos tipos de bacterias (*E. coli* y *Enterococcus sp.*).

Otros autores estudian también el efecto de la intensidad en el tratamiento de fotocátalisis heterogénea llegando a la misma conclusión, al aumentar la intensidad aumenta la inactivación bacteriana (de Souza et al., 2004).

4.1.4. Estudio de la influencia de la dosis de UVA-vis

La Figura 18 muestra el efecto de la dosis de UVA-vis (Intensidad (W/m²) · tiempo (h)) sobre el tratamiento de desinfección de *E. coli* y *Enterococcus sp.* Así, se representan los datos obtenidos para las intensidades de 250, 500 y 750 W/m², a una temperatura media de 22°C. Los tiempos empleados para cada una de las suspensiones bacterianas son:

- *E. coli*: 2, 4, 5, 7, 10, 15, 25 y 60 minutos
- *Enterococcus sp.*: 10, 20, 30 y 60 minutos

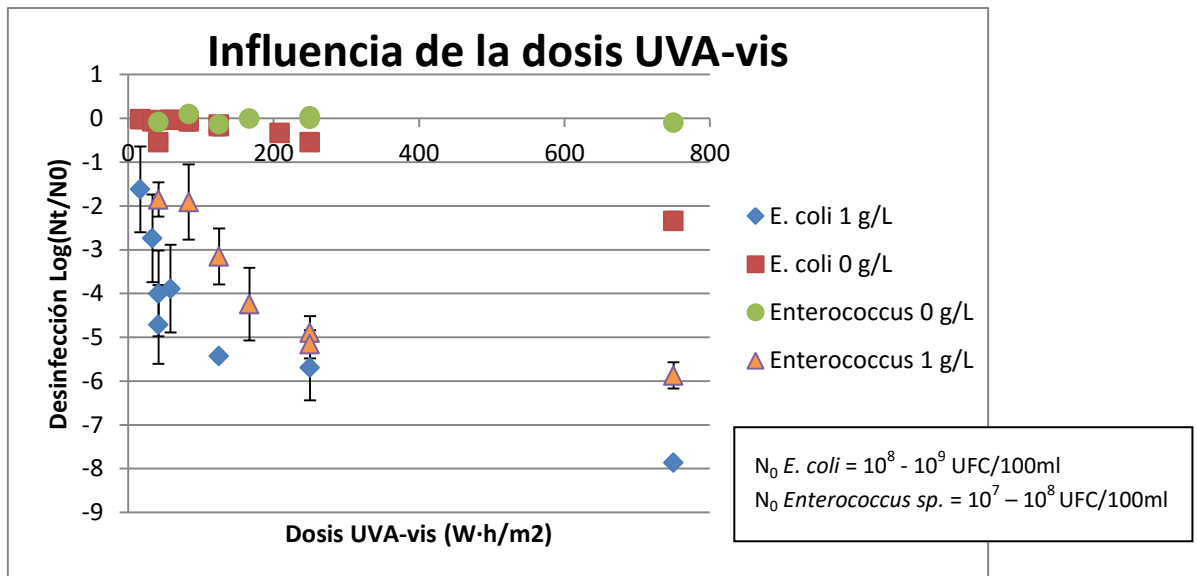


Figura 18. Influencia de la dosis de UVA-vis en la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.*

En la Figura 18 se aprecia un aumento en la desinfección de ambas bacterias cuando se emplea una concentración de TiO_2 de 1 g/L a medida que aumenta la dosis suministrada de UVA-vis. Además, se observa que en el caso de *Enterococcus sp.* la desinfección es menos significativa que para *E. coli*.

4.1.5. Estudio de la influencia de la temperatura

Las Figuras 19, 20, 21 y 22 muestran el efecto de la temperatura sobre la inactivación bacteriana. Para ello, se realizan experimentos para dos tipos de muestras: suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con *E. coli* (SB) y muestra de salida de la depuradora de Tudela denominada como EDAR (números 6, 8 y 9 de la Tabla 4). Las condiciones de operación estudiadas para cada muestra son:

SB con *E. coli*:

- Bacteria estudiada: *E. coli*
- Temperatura: baja, media y alta
- Dosis de TiO_2 : 0 y 1 g/L
- Tiempo: 2, 4, 5, 7, 10, 15, 25 y 60 minutos
- Intensidad de la cámara solar: 250, 500 y 750 W/m^2

EDAR: muestras 6, 7, 8 y 9 de la Tabla 4:

- Bacterias estudiadas: *E. coli* y *Enterococcus sp.*
- Temperatura: baja y media
- Dosis de TiO_2 : 1 g/L
- Tiempo: 10, 20, 30, 60 y 120 minutos
- Intensidad de la cámara solar: 250, 500 y 750 W/m^2

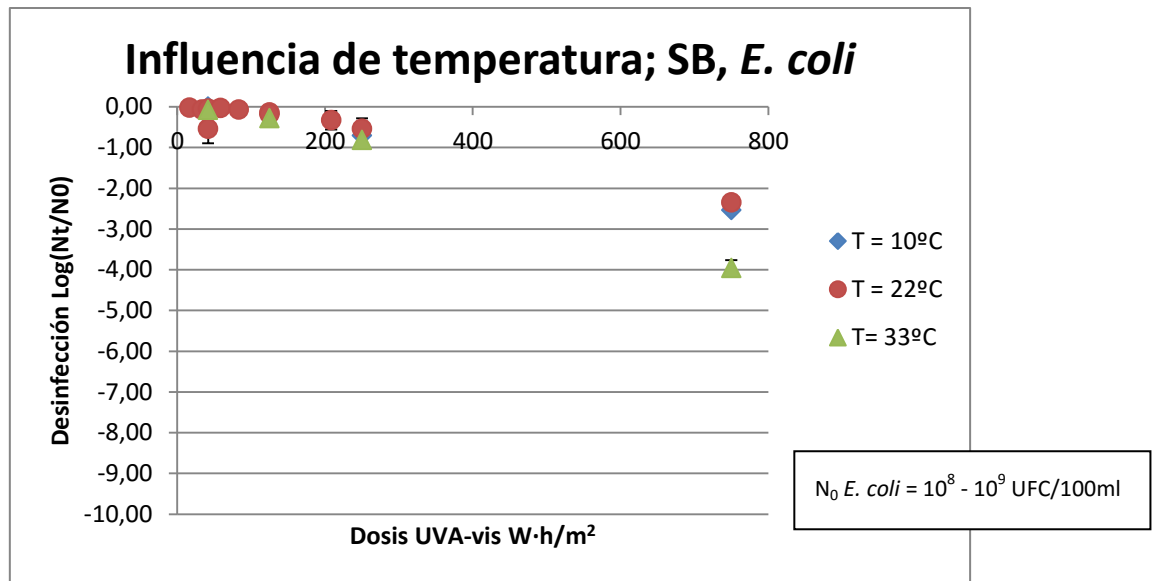


Figura 19. Influencia de la temperatura en la inactivación bacteriana de *E. coli* en SB sin TiO₂.

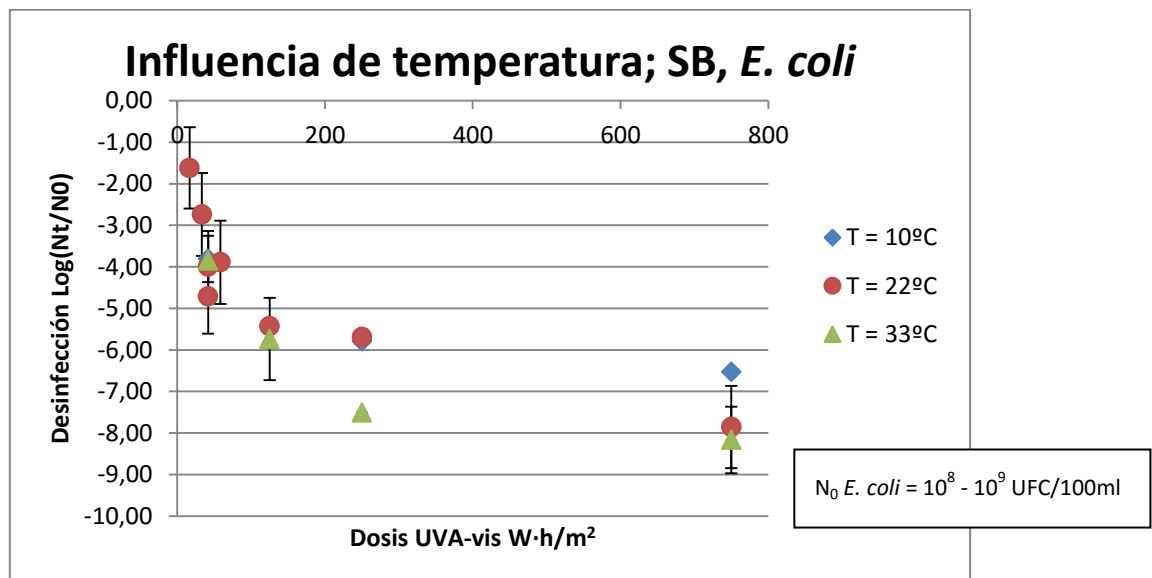


Figura 20. Influencia de la temperatura en la inactivación bacteriana de *E. coli* en SB con TiO₂.

Como se observa en las Figuras 19 y 20 a 10°C se produce una menor inactivación que a 33°C temperatura aunque las diferencias no son muy significativas, cuando el tratamiento se realiza sobre una suspensión bacteriana de *E. coli*. A partir de dosis UVA-vis superiores a 200 Wh/m², se observa que el efecto de la temperatura es importante, obteniendo mayor desinfección a 33°C que a 10°C. Este hecho podría ser debido a que las bacterias tienen menos actividad metabólica a bajas temperaturas (Cho et al., 2004; García-Fernández et al., 2015)

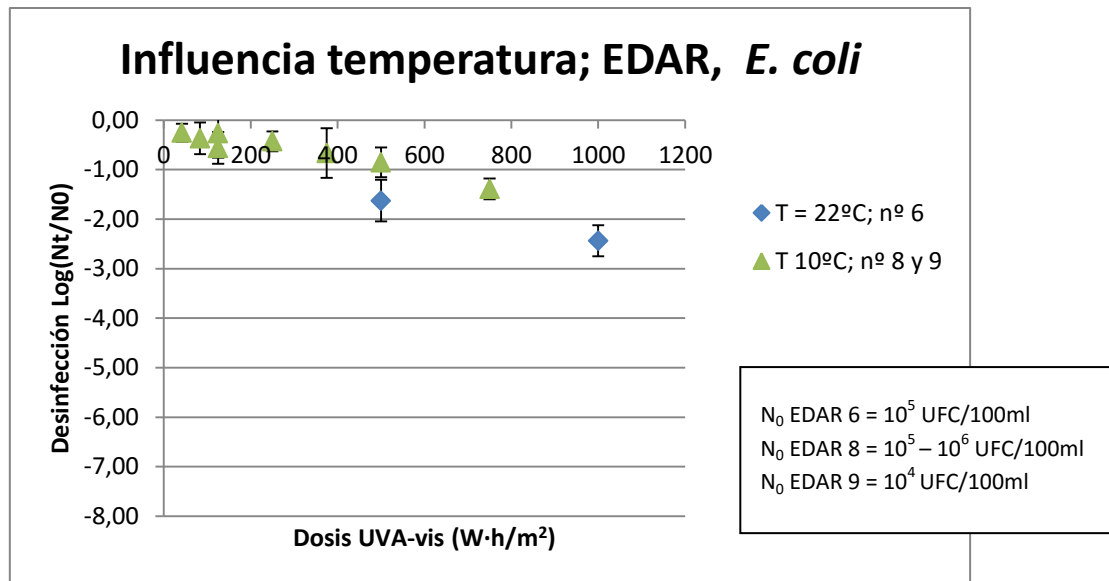


Figura 21. Influencia de la temperatura en la inactivación de *E. coli* en muestra de EDARs.

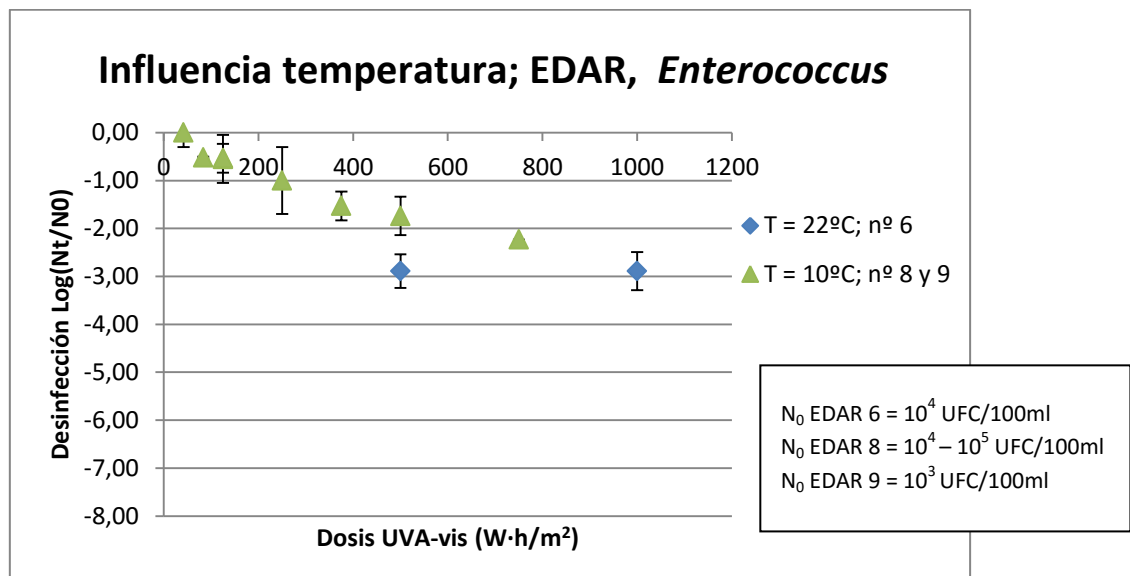


Figura 22. Influencia de la temperatura en la inactivación de *Enterococcus* en muestra de EDARs.

Los resultados presentados en las Figura 21 y 22 muestran que el incremento de temperatura de 10 a 22°C ocasiona un ligero efecto positivo en la desinfección (entre 0,5 – 1 unidades logarítmica).

Algunos autores afirman que a temperatura entre 25-35°C se obtienen una mayor desinfección que cuando el tratamiento se realiza entre 5-15°C (Cho et al., 2004; García-Fernández et al., 2015).

4.1.6. Estudio de la influencia de la matriz

La influencia de la matriz en la desinfección fotocatalítica es un parámetro estudiado por otros autores que afirman que la composición del agua contaminada (iones y materia orgánica) compite con las bacterias por los ROS e impiden la interacción entre éstas y el catalizador (van Grieken et al., 2010).

En las Figuras 23 y 24 se representan la desinfección bacteriana respecto al tiempo de tratamiento. Los experimentos se realizan para 3 tipos de muestras diferentes:

- Suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con *E. coli*. Se denomina SB
- Muestra de salida de depuradora fortificada con *E. coli*: muestra 3, Corella, en la Tabla 4. Se denomina EDAR+SB
- Muestra de salida de depuradora: muestra 1, Corella, en la Tabla 4. Se denomina EDAR

Las condiciones de operación son con 0 y 1 g/L de dióxido de titanio, con una intensidad de 500 W/m^2 y a temperatura de 22°C aproximadamente. Se miden pH y conductividad en los 3 casos como parámetro de control después de los tratamientos de fotocatalisis. La bacteria estudiada en este caso es *Escherichia coli*.

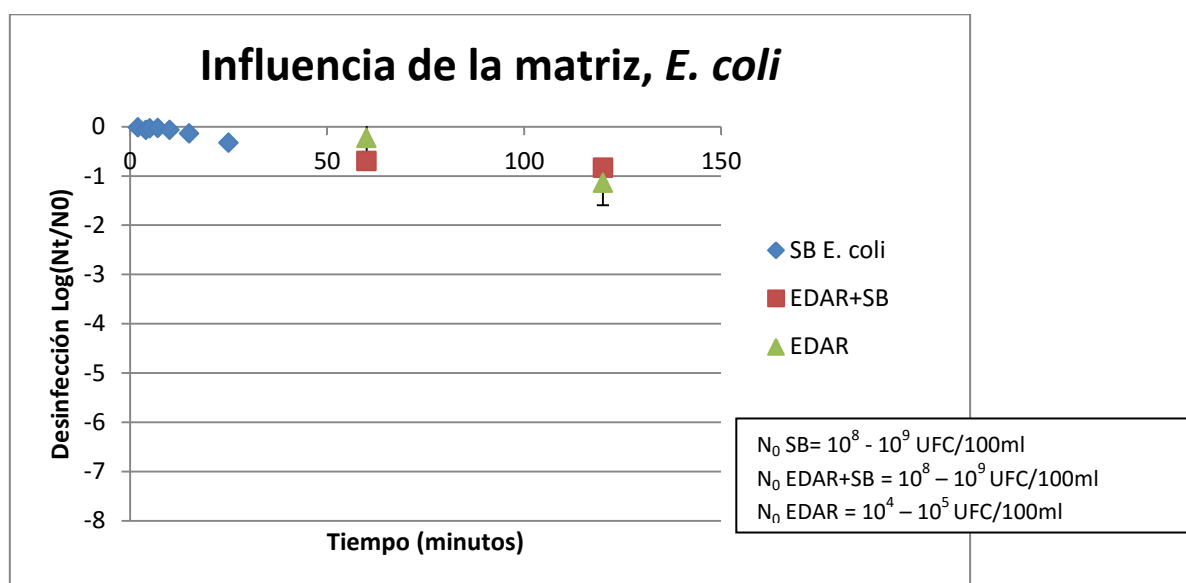


Figura 23. Influencia de la matriz en la inactivación de *E. coli* sin TiO_2 .

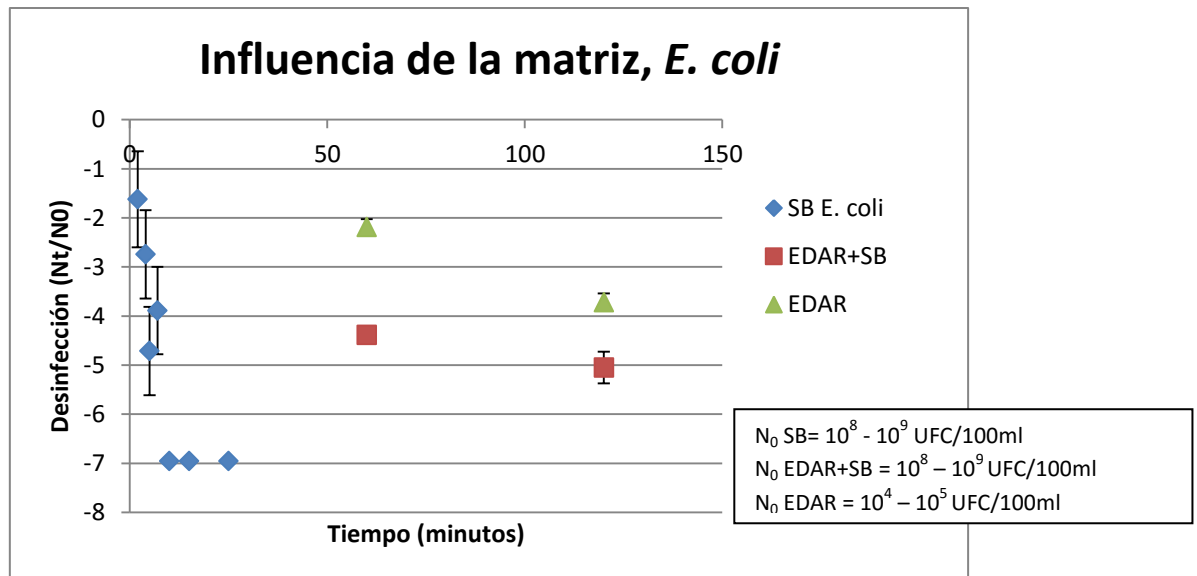


Figura 24. Influencia de la matriz en la inactivación de *E. coli* con TiO_2 .

En la Figura 24 se observa que cuando el tratamiento se aplica sobre una suspensión bacteriana fortificada con *E. coli* se consigue un decrecimiento de 7 unidades logarítmicas a los 10 minutos. Cuando se aplica a agua de salida de depuradora, el tratamiento es menos efectivo alcanzando un decrecimiento de *E. coli* de casi 4 unidades logarítmicas, tras 1 hora de tratamiento. Cuando se aplica sobre muestra de agua de salida de depuradora autoclavada y posteriormente fortificada, se consigue una reducción de 5 unidades logarítmicas en 2 horas.

La Figura 25 muestra los resultados obtenidos en la desinfección de *Enterococcus sp.* en dos tipos de muestras: suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con dicha bacteria y agua de salida de depuradora (EDAR), muestra nº 4 en la Tabla 4. Las condiciones de operación para cada matriz son:

SB con *Enterococcus sp.*:

- Tiempo: 10, 20 y 30 minutos
- Dosis de dióxido de titanio: 0 y 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m²
- Temperatura media

EDAR, Cintruénigo nº4 en la Tabla 4:

- Tiempo: 60 y 120 minutos
- Dosis de dióxido de titanio: 0 y 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m²
- Temperatura media

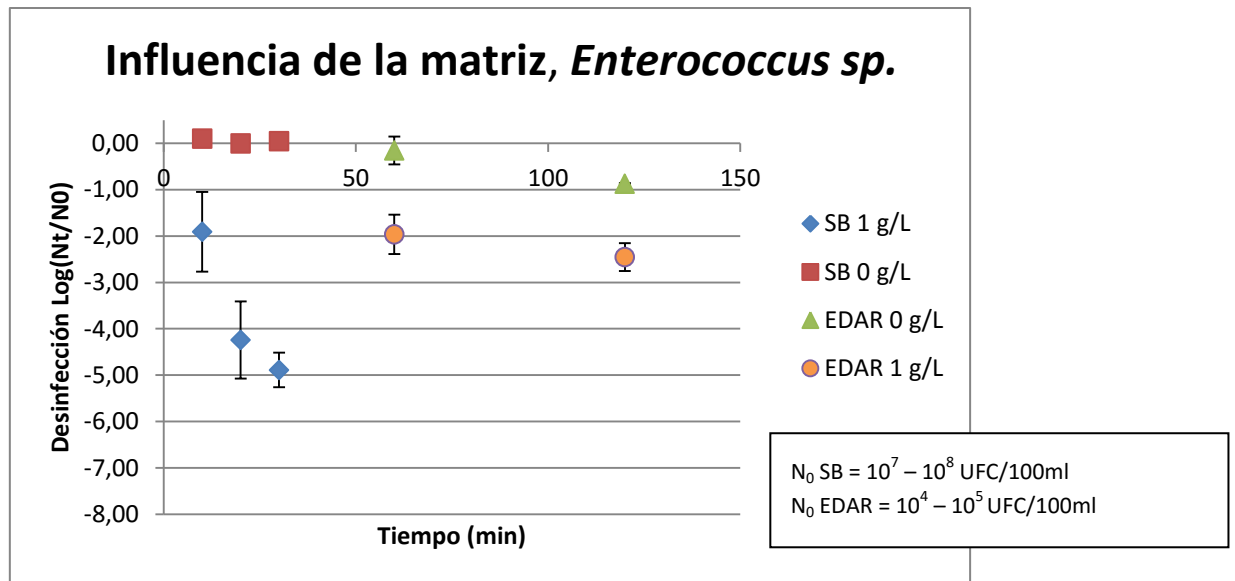


Figura 25. Influencia de la matriz en la inactivación de *Enterococcus sp.*

Como se observa en la Figura 25, la inactivación de *Enterococcus sp.* presente en una suspensión bacteriana es muy superior a la alcanzada cuando esta bacteria está presente en aguas de salida de depuradora (nº 4 en la Tabla 4), consiguiendo una reducción de 5 unidades logarítmicas a los 30 minutos frente a 2,5 aproximadamente para la muestra de EDAR a las 2 horas.

Tal y como describen Rizzo et al. (2014), la eficiencia del TiO_2 en inactivación bacteriana en matriz de agua de salida de depuradora depende de las características de esta agua, del tiempo de tratamiento, de la radiación y de la fuente luminosa.

4.2. Análisis estadístico de variables mediante Statgraphics

En las Figuras 26 y 27 se representan las variables e interacciones más importantes en el proceso a nivel estadístico sobre el factor respuesta. En el Apartado 3.4.2 se explica el diagrama de Pareto en el que se considera que un efecto es significativo cuando sobrepasa la línea discontinua dibujada en el diagrama.

Se utiliza una suspensión bacteriana al 0,9% NaCl con *E.coli* y otra con *Enterococcus sp.* Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo V.

Para estos experimentos las condiciones de operación son:

- Concentración de TiO_2 : 0, 1 g/L
- Tiempo de tratamiento: 10, 60 minutos
- Intensidad: 250, 750 W/m^2
- Temperatura: 10, 33°C para la suspensión bacteriana de *E. coli*. En el caso de *Enterococcus sp.* se realizan experimentos a una temperatura media de 25 °C.

Se miden pH y conductividad tras los experimentos como parámetro de control después del tratamiento de fotocatalisis.

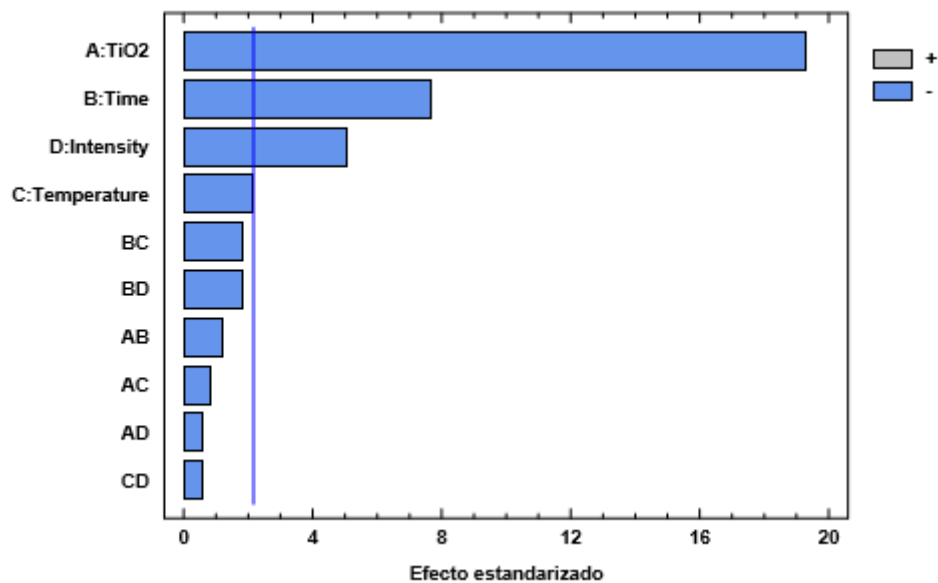


Figura 26. Diagrama de Pareto de inactivación de *E. coli* en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl.

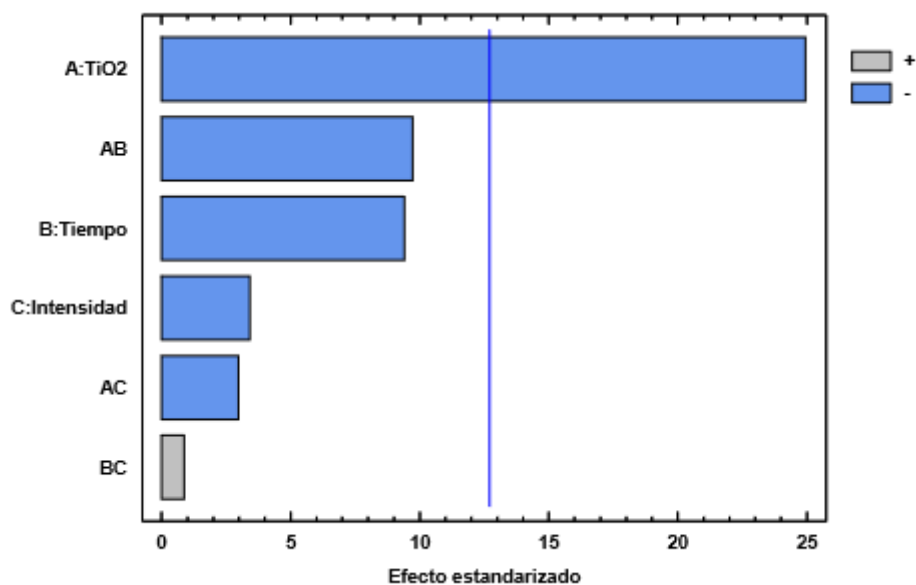


Figura 27. Diagrama de Pareto de inactivación de *Enterococcus sp.* en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl.

La Figura 26 muestra el resultado del análisis estadístico obtenido tras realizar los ensayos de oxidación a concentraciones de 0 y 1 g/L de TiO_2 , durante 10 y 60 minutos, con intensidades de 250 y 750 W/m^2 y a temperaturas de 10 y 33°C. Se observa que la presencia de dióxido de titanio es la variable más influyente en el tratamiento de desinfección. Por tanto, la fotocatalisis es un tratamiento de desinfección más efectivo que la fotólisis (tratamiento con UVA-vis sin catalizador). El tiempo y la intensidad también son influyentes en el tratamiento de desinfección aunque en menor medida. La temperatura no sobrepasa la línea vertical pero

llega a ella, por lo que se puede determinar que, junto con los estudios mostrados en el Apartado 4.1.5, sí tiene un efecto significativo en la reducción de *E.coli*.

Así mismo, la Figura 27 muestra que la variable más influyente es también la dosis de TiO_2 . Sin embargo, las demás variables tienen un efecto menos significativo en la desinfección fotocatalítica ya que no llegan a sobrepasar la línea vertical. Esta línea marca el valor del intervalo de confianza del 95% $p\text{valor} < 0,05$. La interacción de la dosis de catalizador junto con el tiempo es la segunda variable influyente en el tratamiento, seguida del tiempo y la intensidad.

Las Figuras 28 y 29 representan los efectos principales de las variables estudiadas sobre el tratamiento de desinfección en suspensión bacteriana fortificada con *E. coli* y en suspensión bacteriana fortificada con *Enterococcus sp.* La pendiente de la gráfica es indicativa de la importancia de la variable sobre el factor respuesta.

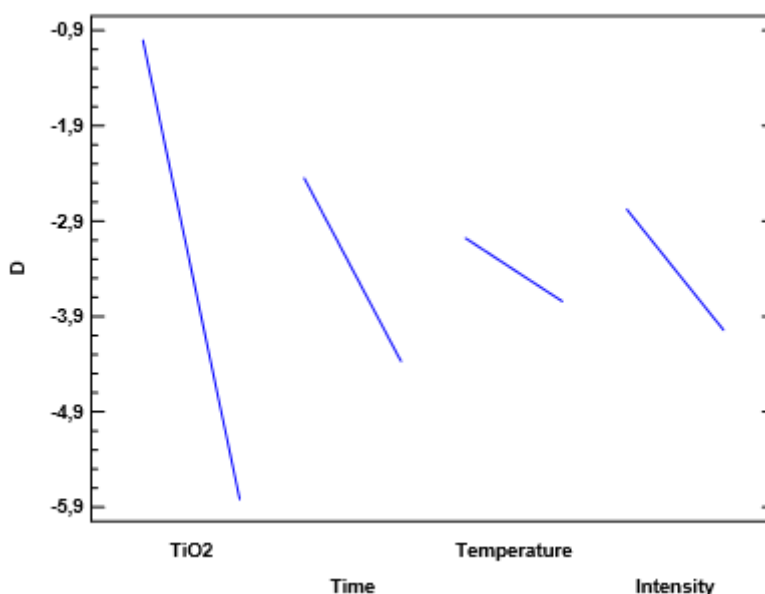


Figura 28. Efectos principales en inactivación de *E.coli*. en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl.

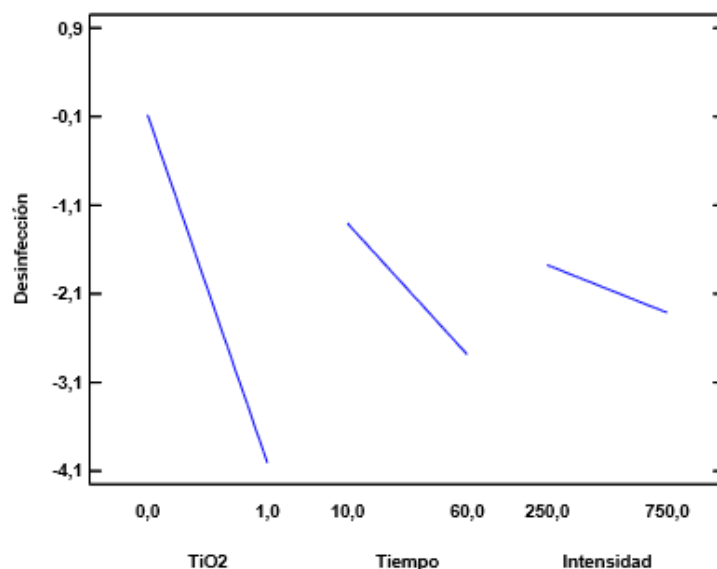


Figura 29. Efectos principales en inactivación de *Enterococcus sp.* en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl.

Como se puede observar en las Figuras 28 y 29, las pendientes de la presencia de catalizador (TiO_2) revelan que tiene un efecto muy significativo en el tratamiento de desinfección de *E. coli* y *Enterococcus sp.* respectivamente. El tiempo y la intensidad de luz tienen un efecto positivo aunque en menor medida en la inactivación de ambas bacterias. El efecto de la temperatura es también relevante en el tratamiento de desinfección de suspensión bacteriana fortificada con *E. coli* (Figura 28).

Una vez determinada la influencia de cada una de las variables seleccionadas, se estudia su interacción (Figura 30). Se observa que existe interacción entre el tiempo y la temperatura en la desinfección de *E. coli* al haber tendencia de las líneas a cruzarse (BD en el gráfico).

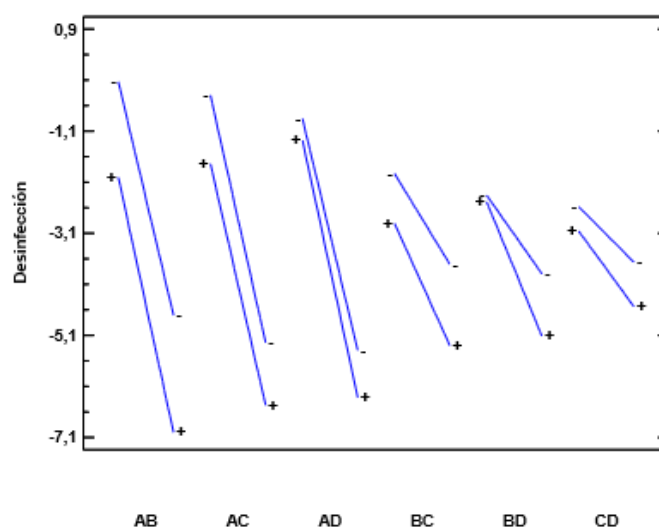


Figura 30. Interacción entre variables en la inactivación de *E. coli* en suspensión bacteriana al 0,9% NaCl.

4.3. Modelización cinética

En este estudio de modelización cinética se analizan los resultados obtenidos en las matrices de suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl fortificadas con *Escherichia coli* y con *Enterococcus sp.* (Apartado 3.2.1).

Los datos experimentales de las curvas de inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* obtenidas en los tratamientos aplicados, se analizan mediante tres modelos matemáticos: modelo de Hom, modelo bifásico y modelo de Weibull. En el Anexo IV se explican con detalle estos modelos.

Suspensión bacteriana con *E. coli*:

Se analiza la cinética para los resultados obtenidos de los tratamientos realizados a esta matriz con las siguientes condiciones de operación:

- Tiempo: 2, 4, 5, 7, 10, 15, y 25 minutos
- Dosis de TiO_2 : 0 y 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m^2
- Temperatura: media

Suspensión bacteriana con *Enterococcus sp.*:

Se analiza la cinética para los resultados obtenidos de los tratamientos realizados a esta matriz con las siguientes condiciones de operación:

- Tiempo: 10, 20, y 30 minutos
- Dosis de TiO_2 : 0 y 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m^2
- Temperatura: media

Las Tablas 6, y 7 recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras aplicar los modelos seleccionados sobre las curvas de inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* Se incluye también el ajuste de cada uno de los modelos mediante el coeficiente de regresión (R) y el error cuadrático medio (ECM).

Los índices ECM y R y la representación de los valores observados y de los valores estimados mediante los diferentes modelos (ver Anexo IV) indican, en general, una buena adecuación de los tres modelos a los valores experimentales de inactivación de *Escherichia coli*. En el caso de *Enterococcus sp.*, los modelos aplicados se ajustan bien a las curvas de inactivación mediante fotocátalisis, pero no es el caso de los tratamientos de fotólisis ya que no hay inactivación para los tiempos estudiados.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la inactivación de *Escherichia coli*.

Modelo	Parámetros	Fotólisis	Fotocatálisis
Hom	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)	0,005	1,025
	m	1,331	0,710
	ECM	0,009	0,257
	R	0,972	0,977
Bifásico	P	0,798	0,969
	k_1	0,017	1,9724
	k_2	0,016	0,8433
	ECM	0,022	0,2726
	R	0,909	0,973
Weibull	δ	77,894	0,858
	p	1,210	0,731
	ECM	0,013	0,250
	R	0,958	0,977

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la inactivación de *Enterococcus sp.*

Modelo	Parámetros	Fotocatálisis
Hom	k_{ap} ($\text{min}^{-1} \cdot \text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)	0,266
	m	0,856
	ECM	0,263
	R	0,986
Bifásico	P	0,844
	k_1	1,972
	k_2	0,313
	ECM	0,254
	R	0,983
Weibull	δ	0,945
	p	0,459
	ECM	0,353
	R	0,959

Según el modelo de Hom (Tablas 6 y 7), la constante aparente para los tratamientos de fotocátalisis en el caso de *Escherichia coli* es mayor que para *Enterococcus sp.*, puesto que en la primera la inactivación es más rápida. En el caso de fotólisis para *E. coli* la constante aparente es mucho menor que para el tratamiento de fotocátalisis debido a que la inactivación es más lenta. El parámetro m es menor que la unidad en los tratamientos de fotocátalisis para ambas bacterias, lo que indica que las curvas son cóncavas y pueden presentar el efecto de cola (ver Figura 8). En el caso de *E. coli*, en el tratamiento de fotólisis, la m es mayor que 1, de modo que la curva es convexa.

El modelo bifásico no es adecuado para describir la inactivación de *Escherichia coli* mediante fotólisis puesto que k_1 y k_2 son prácticamente iguales, lo que indica que no hay dos poblaciones con diferentes resistencias al tratamiento.

En el modelo de Weibull, el parámetro de escala (δ), indica el tiempo necesario para reducir el primer ciclo logarítmico decimal, lo que da una idea de la resistencia de las bacterias al tratamiento en cada uno de los casos estudiados. El alto valor de este parámetro en el tratamiento de fotólisis para *Escherichia coli* indica alta resistencia de esta bacteria a la irradiación UVA-visible en ausencia de dióxido de titanio. El parámetro p es menor que la unidad en los tratamientos de fotocátalisis para ambas bacterias, indicando que la curva es cóncava. Para el tratamiento de fotólisis en *E. coli* el parámetro p es mayor que la unidad, es decir, la curva es convexa, como también se observa en el modelo de Hom.

4.4. Ensayos de reutilización

Una vez decantado el catalizador (Apartado 3.3.1) se estudia su posible reutilización con el fin de reducir los costes del tratamiento.

En estos ensayos de reutilización se estudia la pérdida de eficacia del catalizador (Apartado 3.7) con el uso en los tratamientos de fotocátalisis heterogénea para la desinfección de suspensión bacteriana al 0,9% NaCl fortificada con *Escherichia coli*. Los resultados de los ensayos de reutilización se detallan en el Anexo V.

Las condiciones de operación que se emplean en estos ensayos son:

- Muestra: 200 mL de suspensión bacteriana al 0,9% NaCl con una concentración inicial de 10^9 UFC/ 100mL de *E. coli*
- Tiempo: 15 minutos
- Dosis TiO_2 : 1 g/L
- Intensidad de la cámara solar: 500 W/m^2
- Temperatura media

La Figura 31 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de reutilización del dióxido de titanio.

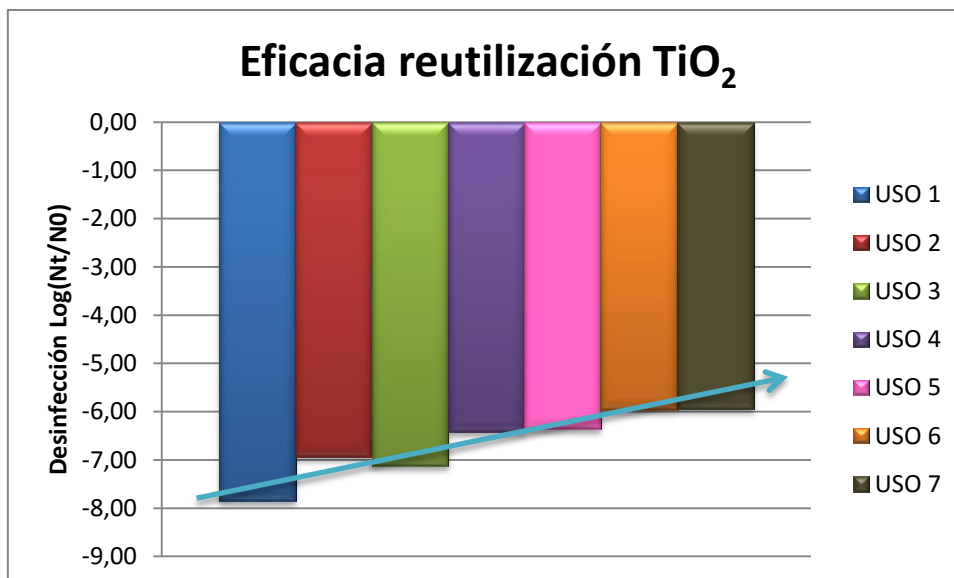


Figura 31. Inactivación bacteriana con reutilización del catalizador.

En la Figura 31 se observa una disminución progresiva de la eficacia del TiO_2 , aunque estos siguen siendo muy elevados. Estos resultados son obtenidos también en la degradación de compuestos orgánicos mediante fotocátalisis heterogénea con TiO_2 de Levenger por otros autores en sus estudios (Escuadra et al. , 2015).

4.5. Ensayos de recrecimiento bacteriano

Tal y como se comenta en el Apartado 3.8 si el tabique celular no resultara completamente dañado por la acción del tratamiento fotocatalítico, las bacterias podrían recrecer haciendo menos efectiva la desinfección.

Por esto, se estudia el recrecimiento de *Escherichia coli* tras 24 horas después del tratamiento de fotocátalisis heterogénea descrito en el Apartado 2.4.2.

No se observa recrecimiento bacteriano en los 7 ensayos realizados, es decir, se observa el mismo valor de microorganismos tras 24 horas en oscuridad después del tratamiento fotocatalítico, es decir, menos de 101 UFC/100ml. Estos resultados también los obtienen otros autores en sus estudios donde no encuentran ninguna colonia tras 24 horas en observación (Chen et al., 2010).

En este estudio se consigue un EDT para *E. coli* en 15 minutos, con una intensidad en la cámara solar de 500 W/m^2 y 1 g/L de TiO_2 . Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Rincón et al., 2004) donde consiguen un EDT con un tratamiento de 60 minutos, con una intensidad de 1000 W/m^2 y una dosis de $0,5 \text{ g/L}$ de TiO_2 . Y (Misstear et al., 2013) alcanza un EDT con un tratamiento entre 15 y 60 minutos en un reactor flujo pistón, con una dosis de catalizador de 50 mg/L .

5. CONCLUSIONES

A continuación se incluyen las principales conclusiones derivadas del presente trabajo de investigación:

- Los tratamientos de fotocátalisis con dióxido de titanio tienen en general poder desinfectante, tomando como referencia criterios establecidos por la EPA, que establece que un agente es desinfectante si se consigue eliminar 1 unidad logarítmica en relación al microorganismo objeto de estudio. Se observa que la capacidad de los tratamientos de fotocátalisis es mayor que los que únicamente se basan en la aplicación de luz UVA-visible. Se observa una posible tendencia en que la inactivación bacteriana aumenta al aumentar la dosis de dióxido de titanio tanto para *Escherichia coli* como para *Enterococcus sp.* pero los resultados no son significativamente superiores.
- La inactivación bacteriana aumenta al aumentar el tiempo de tratamiento fotocatalítico, para *Enterococcus sp.* los resultados son más notables que para *Escherichia coli* ya que, para esta última, hace falta menos tiempo para conseguir su reducción. Para los tratamientos de fotólisis el aumento del tiempo no tiene efectos tan significativos como en fotocátalisis.
- Al analizar tres intensidades diferentes (250, 500 y 750 W/m²), se observa que al aumentar la intensidad de la cámara solar, aumenta la desinfección bacteriana aunque, los resultados para las intensidades de 500 y 750 W/m² no muestran diferencias significativas.
- Al analizar, de forma combinada, la influencia de la intensidad de la cámara solar con el tiempo de tratamiento (dosis UVA-vis) en la desinfección bacteriana, se observa que a medida que aumenta la dosis de UVA-vis, aumenta la reducción bacteriana. Se obtiene una reducción de 8 unidades logarítmicas en *Escherichia coli* y una de 6 unidades logarítmicas para *Enterococcus sp.*
- En cuanto a la temperatura en torno a 10°C no se consigue tanta reducción en la contaminación microbiológica como a 22 y 33°C. Esto es debido a que las bacterias tienen menos actividad metabólica a bajas temperaturas.
- La matriz de la muestra tiene una elevada influencia en la eficacia del tratamiento de fotocátalisis. Se observa que para *E. coli* en suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl se obtiene una reducción de 7 unidades logarítmicas a los 10 minutos. Sin embargo, cuando se trata de agua de salida de depuradora, se reducen hasta 4 unidades logarítmicas en 1 hora y en el caso de agua de salida de depuradora autoclavada y fortificada con esta bacteria, se obtiene una reducción de 5 unidades logarítmicas en 2 horas. Para *Enterococcus sp.* sucede de igual forma, se obtiene una reducción de 5 unidades logarítmicas en 30 minutos en suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl; Sin embargo, para agua de salida de depuradora, se reducen hasta 2,5 unidades logarítmicas en 2 horas.
- La bacteria grampositiva *Enterococcus sp.* es más resistente a los tratamientos basados en irradiación UVA-visible que la bacteria gramnegativa *Escherichia coli*. Bajo las mismas condiciones de operación, se consigue una reducción de 7 unidades

logarítmicas en el caso de *Escherichia coli* mientras que para *Enterococcus sp.* se obtiene una reducción de 3 unidades logarítmicas.

- Se observa una pequeña reducción del poder desinfectante del catalizador TiO_2 , obteniendo una reducción de 8 unidades logarítmicas en el primer uso mientras que, en el séptimo se reducen hasta 6 unidades logarítmicas en los ensayos de reutilización en discontinuo en suspensión bacteriana al 0,9% de NaCl fortificada con *Escherichia coli*.
- El daño producido por los tratamientos de fotocátalisis con la reutilización del catalizador son irreversibles. No se produce recrecimiento bacteriano tras 24 horas en la oscuridad en ninguno de los 7 ensayos de reutilización en discontinuo.

Como conclusión final, la presencia de TiO_2 activado con UVA-visible provoca un aumento en la desinfección de aguas. La composición de la muestra es un factor muy influyente lo que hace que la eficacia de la desinfección disminuya en aguas que contienen otros contaminantes, materia orgánica u otros compuestos oxidables presentes. Por ello, la composición del efluente de EDAR condiciona la eficacia del tratamiento, así como la dosis de catalizador, el tiempo de tratamiento, la intensidad de luz en la cámara solar y la temperatura.

En cuanto a las bacterias estudiadas, *Escherichia coli* es menos resistente que *Enterococcus sp.* a los tratamientos de fotocátalisis heterogénea.

Por último y como consecuencia de que el titanio se considera sustancia peligrosa de Lista II según la legislación vigente y su vertido al medio ambiente está limitado, se hace necesario considerar su separación/eliminación cuando se utiliza en suspensión para tratamiento fotocatalítico en depuración. La reutilización del catalizador resulta efectiva reduciendo así los costes de tratamiento sin una disminución importante de la eficacia. Y además, no se produce recrecimiento bacteriano tras 24 horas en ausencia de luz.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bekbolet, M., y Araz, C. V. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* by photocatalytic oxidation. *Chemosphere*, 32(5), 959–965.
- Blanco, Julián; Malato, Sixto; Estrada, Claudio; Bandala, Erick R.; Gelover, Silvia ; Leal, T. (2001). Purificación de Aguas por Fotocatálisis Heterogénea: Estado del arte. In M. A. Blesa (Ed.), *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea* (pp. 51–77). CYTED.
- Byrne, J. A., Fernandez-Ibañez, P. A., Dunlop, P. S. M., Alrousan, D. M. A., y Hamilton, J. W. J. (2011). Photocatalytic enhancement for solar disinfection of water: A review. *International Journal of Photoenergy*, 2011.
- Byrne, J. A., Fernandez-Ibañez, P. A., Dunlop, P. S. M., Alrousan, D. M. A., y Hamilton, J. W. J. (2011). Photocatalytic enhancement for solar disinfection of water: A review. *International Journal of Photoenergy*, 2011.
- Chen, C. Y., Wu, L. C., Chen, H. Y., y Chung, Y. C. (2010). Inactivation of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* in water using photocatalysis with fixed TiO_2 . *Water, Air, and Soil Pollution*, 212(1-4), 231–238.
- Cho, M., Chung, H., Choi, W., y Yoon, J. (2004). Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO_2 photocatalytic disinfection. *Water Research*, 38(4), 1069–1077.
- Chong, M. N., Jin, B., Chow, C. W. K., y Saint, C. (2010). Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*, 44(10), 2997–3027. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.039>
- Comninellis, C., Kapalka, A., Malato, S., Parsons, S. A., Poullos, I., Mantzavinos, D. (2008). Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for RyD. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*, 83, 769–776.
- Cristina, A., Cordeiro, D. S., Gomes, S., y Leite, F. (2004). Inactivação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* E *Pseudomonas* sp., 27(5), 689–694.
- Eaton, A. D., y Franson, M. A. H. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water y Wastewater*. American Public Health Association.
- Escuadra, S., Gómez, J., Altabás, L., Lasheras, A.M., Bezdicek, J., Ormad, M. P. (2015). Aplicación de nano-fotocatálisis con TiO_2 como tratamiento terciario de agua de salida de depuradora. *Aguasresiduales.info*.
- Fernández-Ibañez, P., Polo-López, M. I., Malato, S., Wadhwa, S., Hamilton, J. W. J., Dunlop, P. S. M., D'Sa, R., et al. (2014). Solar photocatalytic disinfection of water using titanium dioxide graphene composites. *Chemical Engineering Journal*, 261, 36–44.
- Foster, H. A., Ditta, I. B., Varghese, S., y Steele, A. (2011). Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: Spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1847–1868.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., y Díaz, R. (2005). *Manual práctico de microbiología*. Elsevier España.
- García-Fernández, I., Fernández-Calderero, I., Inmaculada Polo-López, M., y Fernández-Ibañez,

- P. (2015). Disinfection of urban effluents using solar TiO₂ photocatalysis: A study of significance of dissolved oxygen, temperature, type of microorganism and water matrix. *Catalysis Today*, 240(PA), 30–38.
- Gelover, S., Gómez, L. A., Reyes, K., y Teresa Leal, M. (2006). A practical demonstration of water disinfection using TiO₂ films and sunlight. *Water Research*, 40(17), 3274–3280.
- van Grieken, R., Marugán, J., Pablos, C., Furones, L., y López, A. (2010). Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram-negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis B: Environmental*, 100(1-2), 212–220. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.07.034>
- Gyürek, L. L., Finch, G. R. (1998). Modeling Water Treatment Chemical Disinfection Kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124, 783–793.
- Hom, L. W. (1972). Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *Journal of Sanitary Engineering Division*, 98, 183–193.
- Iglesias Esteban, R., Ortega de Miguel, E. (2008). Present and future of wastewater reuse in Spain. *Desalination*, 218, 105–119.
- Lanao, M., Ormad, M. P., Mosteo, R., y Ovelleiro, J. L. (2012). Inactivation of *Enterococcus* sp. by photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water. *Solar Energy*, 86, 619–625.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107–113.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., y Gernjak, W. (2009). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1), 1–59.
- Malato, S., Maldonado, M. I., Fernández-Ibáñez, P., Oller, I., Polo, I., y Sánchez-Moreno, R. (2015). Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: The pilot plants of the Plataforma solar de Almería. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 42, 1–9. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369800115300536>
- Matamoros, V., Mujeriego, R., Bayona, J. M. (2007). Trihalomethane occurrence in chlorinated reclaimed water at full-scale wastewater treatment plants in NE Spain. *Water Research*, 41, 3337–3344.
- McGuigan, K. G., Conroy, R. M., Mosler, H.-J., du Preez, M., Ubomba-Jaswa, E., y Fernandez-Ibáñez, P. (2012). Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. *Journal of hazardous materials*, 235-236, 29–46. Retrieved March 15, 2016, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412007960>
- Missteart, D. B. (2013). The Effect of Dark Periods on the UV Photolytic and Photocatalytic Disinfection of *Escherichia coli* in a Continuous Flow Reactor. *Journal of Solar Energy Engineering*, 135(2), 021012. Retrieved from <http://solarenergyengineering.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?doi=10.1115/1.4023179>

- Mosteo, R., Ormad, M. P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, J., García, A., y Clavel, A. (2013). Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 68(3), 575–83. Retrieved February 16, 2016, from https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UAysearch_mode=GeneralSearchyqid=23ySID=N2QEsKqtxzXTCg1tBlRypage=1ydoc=1
- Murray, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología Médica* (7^a ed.). Elsevier, D.L.
- Nesic, J., Rtimi, S., Laub, D., Roglic, G. M., Pulgarin, C., y Kiwi, J. (2014). New evidence for TiO₂ uniform surfaces leading to complete bacterial reduction in the dark: Critical issues. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 593–599. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.060>
- Oppenländer, T. (2003). *Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs) - Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts*. Wiley-VCH.
- Pruitt, K. M., Kamau, D. N. (2007). Mathematical models of bacteria growth, inhibition and death under combined stress conditions. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 221–231.
- Rincón, A. G., y Pulgarin, C. (2003). Photocatalytical inactivation of E. coli: Effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 44(3), 263–284.
- Rincón, A. G., y Pulgarin, C. (2004). Bactericidal action of illuminated TiO₂ on pure Escherichia coli and natural bacterial consortia: Post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental*, 49(2), 99–112.
- Rincón, A.-G., y Pulgarin, C. (2007). Solar Photolytic and Photocatalytic Disinfection of Water at Laboratory and Field Scale. Effect of the Chemical Composition of Water and Study of the Postirradiation Events. *Journal of Solar Energy Engineering*, 129(1), 100. American Society of Mechanical Engineers. Retrieved February 6, 2016, from <http://solarenergyengineering.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?articleid=1457872>
- Rizzo, L., Della Sala, A., Fiorentino, A., y Li Puma, G. (2014). Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp - TiO₂ photocatalysis: Effect on a multi drug resistant Escherichia coli strain. *Water Research*, 53(0), 145–152. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.020>
- Rodríguez-Chueca, J., Morales, M., Mosteo, R., Ormad, M. P., y Ovelleiro, J. L. (2013). Inactivation of Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli present in treated urban wastewater by coagulation-flocculation and photo-Fenton processes. *Photochemical y photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 12(5), 864–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411627>
- Rodríguez-Chueca, J., Mosteo, R., Ormad, M. P., y Ovelleiro, J. L. (2012). Factorial experimental design applied to Escherichia coli disinfection by Fenton and photo-Fenton processes. *Solar Energy*, 86(11), 3260–3267.
- Rodríguez-Chueca, J., Ormad Melero, M. P., Mosteo Abad, R., Esteban Finol, J., y Ovelleiro

- Narvi3n, J. L. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* in fresh water with advanced oxidation processes based on the combination of O₃, H₂O₂, and TiO₂. Kinetic modeling. *Environmental science and pollution research international*, 10280–10290. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703617>
- Rojas-Higuera, N., S3nchez-Garibello, A., Matiz-Villamil, A., Salcedo-Reyes, J. C., Carrascal-Camacho, A. K., y Pedroza-Rodr3guez, A. M. (2010). Evaluaci3n de tres m3todos para la inactivaci3n de coliformes y *Escherichia coli* presentes en agua residual dom3stica, empleada para riego. *Universitas Scientiarum*, 15(2), 139–149.
- Spasiano, D., Marotta, R., Malato, S., Fernandez-Ibañez, P., y Di Somma, I. (2015). Solar photocatalysis: Materials, reactors, some commercial, and pre-industrialized applications. A comprehensive approach. *Applied Catalysis B: Environmental*, 170-171, 90–123.
- Velasco, E., Moreno, A. L., y Giraldo, S. A. (2013). Efecto de la presencia de sales inorg3nicas sobre la inactivaci3n fotocatal3tica de *E. Coli* en agua. *Ingenier3a y Ciencia - ing.cienc.*, 9(17), 193–208. Retrieved from <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/1826>
- Wang, W., Huang, G., Yu, J. C., y Wong, P. K. (2015). Advances in photocatalytic disinfection of bacteria: Development of photocatalysts and mechanisms. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 34, 232–247. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.05.003>